

Wellington de Medeiros Barros

**PREJUÍZO COGNITIVO-EMOCIONAL DE CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS AO MODELO DA SÍNDROME DA DOR
COMPLEXA REGIONAL TIPO I**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa Catarina
como requisito parcial para a obtenção do
Grau de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares
dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Francisney Pinto
do Nascimento.

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Barros, Wellington de Medeiros
PREJUÍZO COGNITIVO-EMOCIONAL DE CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS AO MODELO DA SÍNDROME DA DOR COMPLEXA
REGIONAL TIPO I / Wellington de Medeiros Barros ;
orientador, Adair Roberto Soares dos Santos,
coorientador, Francisney Pinto do Nascimento, 2017.
135 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, , Programa de Pós-Graduação em
Neurociências, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Síndrome da Dor Complexa
Regional. 3. Comprometimento Cognitivo. 4. Déficit
de memória espacial. 5. Comportamento tipo
depressivo. I. Roberto Soares dos Santos, Adair .
II. Pinto do Nascimento, Francisney. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

WELLINGTON DE MEDEIROS BARROS

**“PREJUÍZO COGNITIVO-EMOCIONAL DE
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DA
SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL TIPO I”**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 28 de abril de 2017.

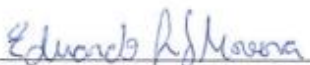


Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:



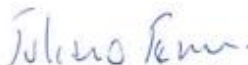
Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Orientador – UFSC




Prof. Eduardo Luiz G. Moreira
Membro – UFSC



Dr. Michael D. da C. Picapedra
Membro – UFSC



Prof. Juliano Ferreira
Membro externo ao Programa



Dra. Rôli Rodrigues Simões
Membro - suplente

*Dedico este trabalho à minha família
e às mulheres da minha vida, Ângela e Camila,
pelo apoio incondicional em todos os momentos.
Sem vocês nenhuma conquista seria possível.*

AGRADECIMENTOS

Acredito que nenhuma batalha é vencida sozinho, e nesta aqui não seria diferente. Sou muito grato por ter cruzado o caminho e conhecido tantas pessoas que se fizeram importantes direta ou indiretamente na construção deste trabalho e de quem sou hoje. Mesmo temendo esquecer alguém, tentarei contemplar a todos nesses agradecimentos. Logo:

Agradeço primeiramente à Deus pela vida e por ter me agraciado com tantas oportunidades de crescimento pessoal e profissional ao longo dessa jornada.

Aos meus pais, Ângela e Heraldo, meus maiores mestres. Desde pequeno me ensinando a importância da educação. Amo vocês!!

À minha irmã e cunhado, Camila e Fábio, por todo o carinho e por terem aberto a porta de sua casa para que eu pudesse morar em dois momentos distintos durante o mestrado. Jamais esquecerei! Muito obrigado!

Ao meu irmão, cunhada e sobrinho, Heraldinho, Ana e Arthur, por mesmo de longe sempre se fazerem presentes e se preocuparem comigo. Família, *#tamojunto*!

À minha sobrinha, Clara, o xodó da família. Você chegou ao mundo no meio dessa pós-graduação e só trouxe alegria! Chegar em casa, te pegar no colo e brincar contigo é o melhor remédio para qualquer tipo de estresse!

Aos meus tios, Cleusa e Asclepiades, pelo carinho e preocupação que sempre tiveram comigo. Muito obrigado por serem esses seres fantásticos que são!

Ao meu amor, Julia Spanhol, pessoa incrível que eu tive a honra de conhecer e morar junto. Amor, me faltam palavras para expressar o quanto teu abraço, tua companhia e o teu brilho me animavam ao chegar em casa. Obrigado por ser a melhor amiga, confidente, parceira do crime e por ter feito da nossa casa um verdadeiro lar! Te amarei para sempre!

Agradeço ao professor Adair Roberto Soares dos Santos por ter aberto as portas do seu laboratório, pelos ensinamentos, paciência e por ter permitido que eu desse início a essa jornada do mestrado. Muito obrigado, professor!

Agradeço ao professor Ney por ter aceitado me coorientar e por ter tido paciência nos seus ensinamentos, pelas sugestões, revisões, palavras de incentivo e por me tranquilizar nas nossas conversas. Muito obrigado!

A minha maior gratidão aos meus amigos e parceiros do LANDI. Sem vocês esse trabalho não teria saído. Os levarei comigo na memória e no coração onde quer que eu esteja!

Aos amigos Igor Coelho, Róli Simões e Fernanda Rodrigues muito obrigado pela ajuda nos experimentos, pelas conversas e questionamentos acerca do trabalho, pelo auxílio na coleta das estruturas, pela realização e análise do ELISA e também pela parceria de sempre. Vocês são demais! Contem comigo para o que for!

Ao amigo Leandro Flores, obrigado por compartilhar saberes, por ser uma fonte segura de informação e tira-dúvidas e pela parceria em alguns projetos paralelos.

À Scheila Kraus, obrigado pelo seu tempo e auxílio na realização dos experimentos!

À Elaine Dalazen, pela amizade, parceria e por ter sobrevivido à uma homogeneização até de madrugada comigo! Sei que jamais esqueceremos!

À *louca* da Thaís, obrigado pelo auxílio na coleta das estruturas, pelas conversas, pela amizade e por saber que posso contar contigo.

Aos amigos Aledson, Gleici e Clécio que emprestaram seu tempo, carro e força física nas idas e vindas semanais de equipamentos entre o CCB antigo e a Farmaco. Obrigado pela parceria!

Aos amigos Fernando, Carol, Rosane, Stelinha, Thaiza, Amanda, Nati, Thaizinha, Jhenifer, Larissa, Tassiane, Marcelo, Marcos e Claudia

obrigado pela parceria, conversas, cafés e momentos de descontração. Estes também são importantes na pós-graduação.

À Larissa Kochenborger, um dos grandes presentes que a pós me trouxe. Sou muito grato por termos cruzado nossos caminhos e ter conseguido desenvolver uma amizade tão verdadeira e sincera! Obrigado por existir!

Agradeço ao professor Rui Prediger que permitiu que eu realizasse os experimentos comportamentais no seu laboratório (Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas - LEXDON), e pelos seus profissionais que sempre foram solícitos e não se importaram em dividir o espaço físico com mais um aluno. Agradecimento em especial à Katiane, Josiel, Andréia, Marina, Tuane e Angela.

Agradeço ao Josiel Mack pelas valiosas considerações sobre o início do projeto, por ter “quebrado muitos galhos” na realização dos experimentos, pelo seu tempo e explicação de como utilizar o ANY-maze e por ter acordado bem cedo em alguns finais de semana para abrir a porta da Farmaco para mim. Obrigado, meu velho!

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Defesas Celulares - em especial ao Gudrian - pelas leituras das placas de ELISA. Obrigado!

Aos amigos Jefferson Alves, Marcos Scherer, Caroline Vizeu e Luís F. Longo, pessoas incríveis as quais tive a sorte de encontrar no meio dessa jornada acadêmica. *Migues*, muito obrigado por existirem na minha vida!

A todos os professores do PPGNeuro que de alguma forma participaram da minha formação acadêmica.

Ao Nivaldo, secretário da Pós-Graduação em Neurociências, sempre solícito e de uma eficiência ímpar para solucionar problemas.

À dona Vilma e o Sr. Carlos pelas conversas descontraídas na cozinha e pela preocupação com o bem-estar dos alunos. Lembrarei de vocês com muito carinho!

Aos camundongos utilizados, ferramentas de estudo desse trabalho. Meu profundo respeito.

À Florianópolis, ilha querida que me trouxe tantas coisas boas e me acolheu com tanto carinho desde o primeiro dia em que coloquei os pés aqui.

À Universidade Federal de Santa Catarina, lugar que eu sempre quis estudar e onde pude crescer, conhecer pessoas fantásticas e desenvolver esta pesquisa.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Por fim, agradeço a todos aqueles que porventura eu tenha esquecido de mencionar nessas palavras, mas que tenham contribuído de alguma forma para a realização deste trabalho. Minha mais profunda gratidão!

“Somos o que fazemos, mas somos principalmente o que fazemos para mudar o que somos.”

Eduardo Galeano

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”

Albert Einstein

RESUMO

A Síndrome da Dor Complexa Regional tipo I (SDCR-I) é um grave problema de saúde e caracteriza-se como uma condição clínica dolorosa, incapacitante e muitas vezes crônica. Embora a dor seja a queixa mais comum de pacientes com dores crônicas, eles também apresentam outras importantes comorbidades associadas como comprometimentos cognitivos, ansiedade e depressão. Além disso, sabemos que o hipocampo é uma estrutura encefálica chave no processamento mnemônico, influenciando não só a formação de memórias, como também os aspectos emocionais e a dor. Nesse sentido, este estudo visa avaliar o componente cognitivo-emocional em animais adultos jovens (6 meses) e de meia idade (12 meses) submetidos ao modelo de SDCR-I através da avaliação da dor, memória espacial, ansiedade e depressão, bem como da participação do hipocampo e da medula espinal e de mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no componente cognitivo-emocional. Para isto, camundongos C57BL/6 machos (6 e 12 meses de idade) foram divididos em grupos: controle (grupo – não lesionado) e DPIC (Dor Pós-Isquemia Crônica – grupo lesão). O grupo controle teve a colocação de 5 anéis elásticos cortados na articulação do tornozelo da pata traseira direita, durante 3 h. O grupo DPIC sofreu lesão isquêmica por compressão pela colocação dos 5 anéis elásticos na articulação do tornozelo da pata traseira direita por 3 h. Após os anéis foram cortados reestabelecendo o fluxo sanguíneo e promovendo aumento da lesão por Isquemia-Reperusão (IR). Os animais foram avaliados por 16 dias a fim de verificar se o modelo proposto reproduziria os sinais da SDCR-I como nocicepção (testes de alodínia mecânica e hiperalgesia térmica ao frio), edema, hipertermia (aumento da temperatura da pata), capacidade locomotora (Campo Aberto), comportamento tipo-ansioso (testes do labirinto em cruz elevado – LCE), comportamento tipo-depressivo (testes da suspensão da Cauda e *Splash Test*), memória espacial (teste do Y-maze). No 17º dia os animais foram eutanasiados e o hipocampo e a medula espinal foram coletados para quantificação das concentrações de TNF- α e BDNF. A lesão provocada pela IR da pata de camundongos com 6 ou 12 meses de idade produziu os sinais da SDCR-I (alodínia mecânica observada no teste do von Frey; hiperalgesia térmica ao frio observada no teste da placa fria; edema e aumento de temperatura da pata), bem como os comportamentos relacionados a ansiedade (alterações no número de entrada e do tempo de permanência nos braços abertos no teste do LCE)

e depressão (aumento do tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda e comportamento de anedonia no *Splash Test*) e o déficit de memória espacial de curta duração (teste do Y-maze). Além disto, os animais adultos jovens e de meia idade submetidos ao IR apresentam aumento das concentrações de TNF- α e BDNF na medula espinal e de TNF- α no hemisfério esquerdo do hipocampo e redução do BDNF no hemisfério esquerdo e aumento no hemisfério direito do hipocampo dos camundongos adultos jovens, fato este que pode explicar as respostas comportamentais apresentadas. Coletivamente, esses dados confirmam que os camundongos adultos jovens e meia idade com SDCR-I apresentam além da dor, déficit de memória espacial, ansiedade e depressão. Estas alterações estão associadas, pelo menos em parte, ao desequilíbrio nas concentrações de TNF- α e BDNF na medula espinal e no hipocampo dos animais com SDCR-I.

Palavras chave: Síndrome da Dor Complexa Regional. Comprometimento cognitivo. Déficit de memória espacial. Comportamento tipo-ansioso. Comportamento tipo-depressivo.

ABSTRACT

Complex Regional Pain Syndrome (CRPS-I) is a serious health problem and is characterized as a painful, disabling and often chronic clinical condition. Although pain is the most common complaint of patients with chronic pain, they also have other important associated comorbidities such as cognitive impairments, depression and anxiety. In addition, we know that the hippocampus is a key brain structure in mnemonic processing, influencing not only memory formation, but also emotional aspects and pain. In this sense, this study aims to evaluate the cognitive-emotional component in young and aged animals submitted to the CRPS-I model through the evaluation of pain, spatial memory, anxiety and depression, as well as the participation of hippocampus and spinal cord and inflammatory mediators, such as the Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the cognitive-emotional component. For this, male C57BL/6 mice (6 and 12 months of age) were divided into groups: control (Sham group) and CPIP (Chronic Post-Ischemia Pain - injured group). The control group had 5 elastic o-rings cut at the ankle joint of the right hind paw for 3 h. The CPIP group suffered ischemic compression injury by placing the 5 elastic o-rings at the ankle joint of the right hind paw for 3 h. After it, the o-rings were cut reestablishing blood flow and promoting ischemia-reperfusion injury (IR). The animals were evaluated for 16 days in order to verify if the proposed model would reproduce the signs and symptoms of CRPS-I as nociception (mechanical allodynia and cold hyperalgesia tests), edema, hyperthermia (temperature increasing in the paw), locomotor capacity (Open Field), anxiety-like behaviour (Elevated Plus Maze test – EPM), depressive-like behaviour (Tail Suspension test and Splash Test), spatial memory (Y-maze). On the 17th day the animals were euthanized and the hippocampus and spinal cord were collected for quantification of TNF- α and BDNF concentrations. The injury caused by the IR of the paw of young adult and middle age mice produced the signs of CRPS-I (mechanical allodynia observed in the von Frey test, cold thermal hyperalgesia observed in the cold plate test, edema and increase in paw temperature), as well as anxiety-like behaviors (changes in number and length of stay in the open arms in the PM test), and depressive-like (increased immobility time in the tail suspension test and anhedonia behavior in the Splash Test) and the deficit in short memory (Y-maze test). In addition, it was observed that young adult and middle age animals submitted to IR presented increased concentrations of TNF- α and BDNF in the spinal cord and increased concentration of TNF- α in the left

hemisphere of the hippocampus and reduction of BDNF in the left hemisphere and increase in the right hemisphere of the hippocampus of young adult mice, a fact that may explain the behavioral responses presented. Collectively, these data confirm that the young adult and middle age mice with CRPS-I present in addition to pain, spatial memory deficit, anxiety and depression. These changes are associated, at least in part, with imbalance in TNF- α and BDNF concentrations in the spinal cord and hippocampus of the animals with CRPS-I.

Key words: Complex Regional Pain Syndrome. Cognitive impairment. Spatial memory deficit. Anxiety-like behavior. Depressive-like behavior.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AC	Adenilato Ciclase
AINEs	Anti-Inflamatórios Não-Esteroidais
AMPc	Monofosfato Cíclico de Adenosina (do inglês, <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>)
ASIC	Canais iônicos sensíveis à ácidos (do inglês <i>Acid-Sensing Ion Channels</i>)
ATP	Adenosina Tri Fosfato
BA	Braço Aberto
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>)
BF	Braço Fechado
BHE	Barreira Hematoencefálica
CA	Campo Aberto
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (do inglês <i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>)
cm	centímetro
°C	Graus Celsius
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DPIC	Dor Pós Isquemia Crônica
DSI	Dor Simpaticamente Independente
DSM	Dor Simpaticamente Mantida
DSR	Distrofia Simpático-Reflexa

EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (do inglês <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>)
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EMG	Eletromiografia
EPM	Erro Padrão da Média
g	grama
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico (do inglês <i>Gamma-AminoButyric Acid</i>)
GPCR	Receptores Acoplados a Proteína G (do inglês <i>G Protein–Coupled Receptors</i>)
GRD	Gânglio da Raiz Dorsal
h	hora
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês <i>International Association for the Study of Pain</i>)
i.c.v.	Intracerebroventricular
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IMG	Imagens Motoras Graduadas
IR	Isquemia-Reperfusão
JAK	Janus Quinase
kg	quilograma

K2P	Canais de Potássio de Dois Poros (do inglês <i>Two-Pore Domain Potassium</i>)
LANDI	Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação
LC	<i>Locus Coeruleus</i>
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LTP	Potenciação de Longa Duração (do inglês <i>Long Term Potentiation</i>)
MAPK	Proteína Quinase Ativada Por Mitogénio (do inglês <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>)
m/s	metros/segundos
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	Milimolar
Na⁺	íon Sódio
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
ng	nanograma
NGF	Fator de Crescimento do Nervo (do inglês <i>Nerve Growth Factor</i>)
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
PAG	Substância Cinzenta Periaquedutal (do inglês <i>Periaqueductal Gray</i>)
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonila (do inglês <i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>)
pg	picograma
RL	Radicais Livres

ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>)
RTK	Receptores de Tirosina Quinases (do inglês <i>Receptor Tyrosine Kinases</i>)
RVM	Medula Rostroventral (do inglês <i>Rostroventral Medulla</i>)
SDCR-I	Síndrome da Dor Complexa Regional tipo I
S1	Córtex Somatossensorial Primário
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SP	Substância P
STAT	Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição (do inglês <i>Signal Transducers And Activators of Transcription</i>)
TCC	Terapia Cognitivo-Comportamental
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alpha (do inglês <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>)
TNRF1	Receptor de TNF tipo I
TRP	Potencial Receptor Transiente (do inglês <i>Transient Receptor Potential</i>)
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VCN	Velocidade de Condução Nervosa

LISTA DE SÍMBOLOS

α - Alfa

β - Beta

γ - Gama

Δ - Delta

κ - Kappa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação das fibras aferentes primárias, atividade elétrica e intensidade da dor.....	32
Figura 2. Organização laminar do corno dorsal da medula espinal e inputs dos aferentes primários.....	33
Figura 3. Anatomia da via da dor.....	34
Figura 4. Silas Weir Mitchell (1829 – 1914).....	36
Figura 5. Sinais clínicos em membros superiores em pacientes com SDCR.	42
Figura 6. Sinais clínicos em membros inferiores em pacientes com SDCR.	42
Figura 7. Mediadores periféricos da inflamação.	46
Figura 8. Reorganização cortical e plasticidade mal adaptativa em um paciente com SDCR-I.....	49
Figura 9. Fisiopatologia e opções de tratamento na SDCR-I.	56
Figura 10. Anéis elásticos.	64
Figura 11. Esquema do protocolo de lesão por isquemia-reperfusão da pata.	64
Figura 12. Micrômetro Digital.	65
Figura 13. Termômetro Digital.	66
Figura 14. Avaliação da nocicepção da pata.	67
Figura 15. Placa Fria.	67
Figura 16. Labirinto em Cruz Elevado.....	69
Figura 17. Campo Aberto.....	69
Figura 18. Y-maze.....	70
Figura 19. Imagens ilustrando os comportamentos obtidos no teste de suspensão da cauda.....	71
Figura 20. Design do protocolo experimental.	73

Figura 21. Imagens representativas da pata de camundongos antes, durante e após a IR.....	75
Figura 22. Alodínia mecânica na pata de camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).....	77
Figura 23. Hipersensibilidade térmica ao frio (5°C) na pata de camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).....	78
Figura 24. Edema da pata induzido pela IR em camundongos.	80
Figura 25. Aumento da temperatura da pata induzido pela IR em camundongos.	82
Figura 26. Peso corporal total dos camundongos.....	84
Figura 27. Atividade locomotora em camundongos avaliados no teste do Campo Aberto.	85
Figura 28. Atividade locomotora e comportamento tipo-ansioso induzido pela IR em camundongos no teste do Labirinto em Cruz Elevado.	87
Figura 29. Avaliação do comportamento tipo-depressivo em camundongos utilizando o teste da suspensão da cauda.	89
Figura 30. Avaliação de comportamento relacionado a depressão em camundongos utilizando o Splash Test.	89
Figura 31. Avaliação da memória espacial em camundongos utilizando a tarefa do Y-maze modificado.....	92
Figura 32. Concentrações de TNF- α no hipocampo de camundongos que passaram ou não pelo protocolo de indução da SDCR-I através da IR da pata.....	94
Figura 33. Concentrações de TNF- α na medula de camundongos que passaram ou não pelo protocolo de indução da SDCR-I através da IR da pata.....	95
Figura 34. Concentrações de BDNF no hipocampo de camundongos que passaram ou não pelo protocolo de indução da SDCR-I através da IR da pata.....	96
Figura 35. Concentrações de BDNF na medula espinal de camundongos que passaram ou não pelo protocolo de indução da SDCR-I através da IR da pata.	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios clínicos para diagnóstico da SDCR.....	40
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
1.1	DOR E NOCICEPÇÃO.....	31
1.2	SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL: CONTEXTO HISTÓRICO.....	35
1.3	DESCRIÇÃO E DIAGNÓSTICO.....	39
1.4	EPIDEMIOLOGIA.....	43
1.5	FISIOPATOLOGIA.....	43
1.5.1	ISQUEMIA-REPERFUSÃO.....	43
1.5.2	PROCESSO INFLAMATÓRIO: SENSIBILIZAÇÃO CENTRAL E PERIFÉRICA.....	45
1.5.3	PLASTICIDADE CORTICAL MAL ADAPTATIVA.....	48
1.6	ANSIEDADE E DEPRESSÃO.....	50
1.7	FATORES NEUOTRÓFICOS.....	50
1.8	MEMÓRIA.....	51
1.9	TRATAMENTO DA SDCR-I.....	52
1.9.1	FISIOTERAPIA.....	53
1.9.2	FARMACOTERAPIA.....	54
1.9.3	TERAPIA COGNITIVO-COMPORTAMENTAL.....	54
1.10	MODELO EXPERIMENTAL DA SDCR-I.....	56
2	JUSTIFICATIVA	59
3	OBJETIVOS	61
3.1	OBJETIVO GERAL.....	61
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	61
4	MATERIAIS E MÉTODOS	63
4.1	ANIMAIS.....	63
4.2	INDUÇÃO DA LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO DA PATA.....	63
4.3	AVALIAÇÃO DOS SINAIS.....	65

4.3.1	MENSURAÇÃO DA ESPESSURA (EDEMA) DA PATA.....	65
4.3.2	MENSURAÇÃO DA TEMPERATURA DA PATA.....	65
4.3.3	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA NOCICEPTIVA NA PATA: TESTE DE VON FREY.....	66
4.3.4	AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE TÉRMICA AO FRIO: TESTE DA PLACA FRIA.....	67
4.3.5	AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL.....	68
4.3.6	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO RELACIONADO À ANSIEDADE: TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	68
4.3.7	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO LOCOMOTORA: TESTE DO CAMPO ABERTO.....	69
4.3.8	AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA ESPACIAL: TESTE DO Y-MAZE MODIFICADO.....	70
4.3.9	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO RELACIONADO À DEPRESSÃO.....	71
4.3.9.1	TESTE DE SUSPENSÃO DA CAUDA.....	71
4.3.9.2	<i>SPLASH TEST</i>	72
4.4	QUANTIFICAÇÃO DE TNF- α e de BDNF.....	72
4.5	LINHA DO TEMPO DOS EXPERIMENTOS.....	73
4.6	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	73
5	RESULTADOS	75
5.1	EFEITOS DA IR SOBRE A ALODÍNIA MECÂNICA E HIPERSENSIBILIDADE TÉRMICA AO FRIO.....	76
5.2	EFEITOS DA IR NO EDEMA E NA TEMPERATURA DA PATA.....	79
5.3	EFEITOS DA IR NO PESO CORPORAL E ATIVIDADE LOCOMOTORA DOS ANIMAIS.....	83
5.4	EFEITOS DA IR SOBRE COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À ANSIEDADE.....	86
5.5	EFEITOS DA IR SOBRE COMPORTAMENTOS RELACIONADOS A DEPRESSÃO.....	88

5.6	EFEITOS DA IR SOBRE A MEMÓRIA ESPACIAL....	90
5.7	AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA “EX VIVO”.....	93
5.7.1	EFEITO DA IR SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE TNF- α NO HIPOCAMPO E MEDULA DOS CAMUNDONGOS.....	93
5.7.2	EFEITO DA IR NAS CONCENTRAÇÕES DE BDNF NO HIPOCAMPO E MEDULA ESPINAL DOS CAMUNDONGOS.....	96
6	DISCUSSÃO	99
7	CONCLUSÃO	111
	REFERÊNCIAS.....	113

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOR E NOCICEPÇÃO

A capacidade de detectar estímulos nocivos é essencial para a sobrevivência e bem-estar de um organismo (Basbaum *et al.*, 2009). Assim, em organismos mais complexos e organizados, existem sistemas fisiológicos que se adaptaram e são capazes de reconhecer diferentes estímulos potencialmente lesivos.

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) a dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tais danos. Baseado neste conceito, o termo dor seria melhor aplicado a seres humanos do que aos animais, pelo fato deste termo envolver um componente emocional (Klaumann *et al.*, 2008).

O componente fisiológico da dor, também chamado de nocicepção, consiste nos processos de transdução, transmissão e modulação de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo (Klaumann *et al.*, 2008). De maneira simplificada, três neurônios fazem parte deste processo: (1) neurônio de primeira ordem (ou neurônio sensorial) – cujo corpos celulares concentram-se no gânglio da raiz dorsal (GRD) da medula (corpo) ou no gânglio do nervo trigêmeo (face) - de onde partem os ramos axonais periféricos e centrais, que por sua vez inervam os órgãos-alvo e a medula espinal, respectivamente; (2) neurônio de segunda ordem – o qual ascende pela medula espinal em direção ao tálamo e cerebelo; e (3) neurônio de terceira ordem – o qual projeta-se para o córtex cerebral (Tranquilli, 2004; Messlinger, 1997).

No início do processamento nociceptivo ocorre a transdução de estímulos mecânicos, térmicos e químicos em impulsos elétricos em terminais nervosos especializados denominados nociceptores (Pisera, 2005). Estes correspondem às terminações nervosas livres dos neurônios de primeira ordem (sensoriais), cuja função é preservar a homeostasia tecidual, sinalizando assim uma lesão real ou potencial (Klaumann *et al.*, 2008). Os neurônios sensoriais podem ainda ser classificados em três grandes grupos, segundo seu calibre (diâmetro), seu grau de mielinização e sua velocidade de condução (Figura 1 A-C) em:

- Fibras Aα/Aβ: são fibras calibrosas ($\geq 10 \mu\text{m}$ de diâmetro), mielinizadas e de condução rápida (30-100 m/s). Na ausência de dano tecidual ou nervoso, essas fibras somente transmitem

informação referente a estímulos inócuos, como tato, vibração e pressão (Figura 1 A-C);

- Fibras A δ : são mielinizadas, com diâmetro (2 a 6 μm) e velocidade de condução intermediários (1,2-30 m/s), modulando a primeira fase (aguda) da dor (Figura 1 A-C);
- Fibras C: são fibras de pequeno diâmetro (0,4 a 1,2 μm), não mielinizadas e de velocidade de condução lenta (0,5-2 m/s), responsáveis pela segunda dor ou dor difusa, de queimação persistente (Figura 1 A-C).

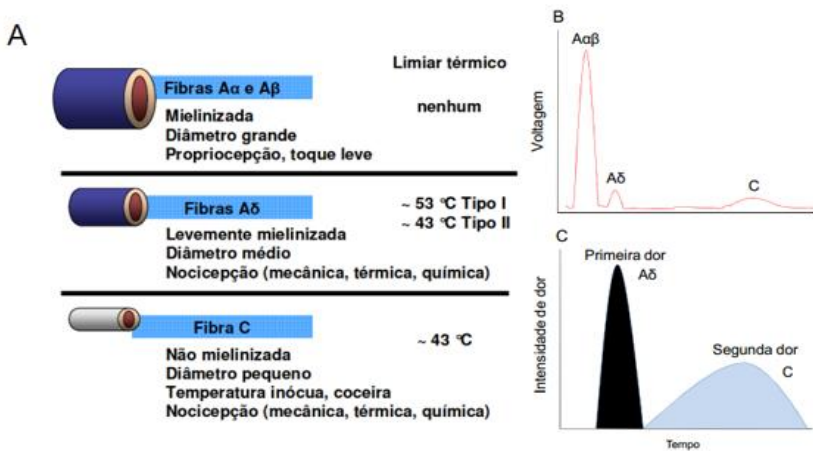


Figura 1. Classificação das fibras aferentes primárias, atividade elétrica e intensidade da dor.

(A) - Tipos de fibras aferentes primárias e suas principais características; (B) – Descarga elétrica de fibras nociceptivas; (C) – Relação intensidade X tempo da dor (Adaptado de Julius e Basbaum, 2001).

As fibras nervosas de aferentes primários projetam-se para o corno dorsal da medula espinal, onde são encontradas estruturas com distinção anatômica e eletrofisiológica, denominadas lâminas de Rexed (Basbaum e Jessell, 2000) (Figura 2). As fibras A δ , por exemplo, projetam-se para as lâminas I e V (mais profunda) (Purves *et al.*, 2010). Já os aferentes A β , que apresentam baixo limiar de disparo, rápida condução, e respondem ao toque leve, projetam-se para III, IV e V (Basbaum *et al.*, 2009), enquanto as fibras C projetam-se mais superficialmente entre as lâminas I e II.

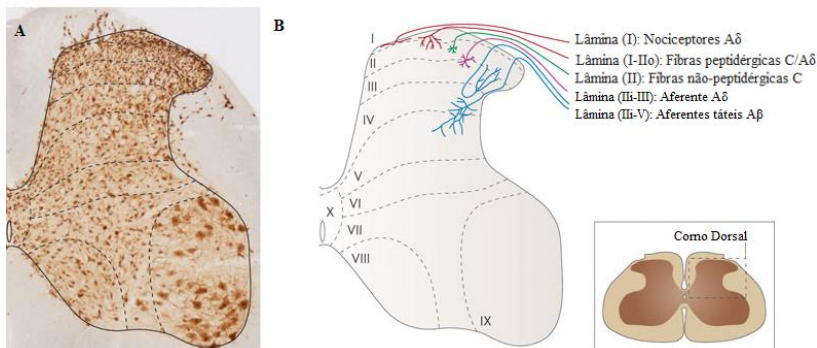


Figura 2. Organização laminar do corno dorsal da medula espinal e inputs dos aferentes primários.

Rexed (1952) dividiu a substância cinzenta do corno dorsal da medula em uma série de lâminas paralelas com base em variações de tamanho e densidade dos corpos dos neurônios. Painel (A) – mostra uma secção transversal de medula espinal lombar que foi corada utilizando o anticorpo (NeuN) que marca especificamente neurônios. Os limites laminares são mostrados pelas linhas tracejadas. Lamina I e lamina II (também conhecidas como zona marginal e substância gelatinosa, respectivamente) constituem o corno dorsal superficial e são caracterizadas pela presença de numerosos pequenos neurônios. Lamina II pode ser dividida em partes externas (IIo) e internas (IIi), com IIi tendo uma densidade um pouco menor de neurônios. Painel (B) - As aferências primárias arborizam-se dentro do corno dorsal de forma ordenada: um padrão de terminação laminar baseado no diâmetro e função da fibra é sobreposto a uma distribuição somatotópica que determina a localização mediolateral e rostrocaudal. As terminações centrais dos principais tipos aferentes primários (excluindo proprioceptores) são mostradas (Adaptado de Todd, 2010).

Os neurônios de projeção dentro das lâminas I e V constituem a principal saída da informação nociceptiva no corno dorsal para o cérebro (Basbaum e Jessell, 2000). Esses neurônios estão na origem de múltiplas vias ascendentes, incluindo os tratos espinotalâmico e espinoreticulotalâmico, que enviam mensagens de dor para o tálamo e tronco encefálico, respectivamente (Basbaum *et al.*, 2009). O primeiro é particularmente relevante para os aspectos sensorio-discriminativos da experiência da dor (isto é, onde está o estímulo e quão intenso é), enquanto que o segundo pode ser mais relevante para dores mal localizadas (Basbaum *et al.*, 2009).

A partir do tronco encefálico e tálamo, a informação ascende às estruturas corticais. Não existe uma única área cerebral particular para a dor (Apkarian *et al.*, 2005). Ao invés disso, a dor resulta da ativação de um grupo distribuído de estruturas, algumas das quais estão mais associadas com as propriedades sensório-discriminativas (como o córtex somatossensorial) e outras com os aspectos emocionais (como o giro cingulado anterior e o córtex insular) (Figura 3) (Basbaum *et al.*, 2009).

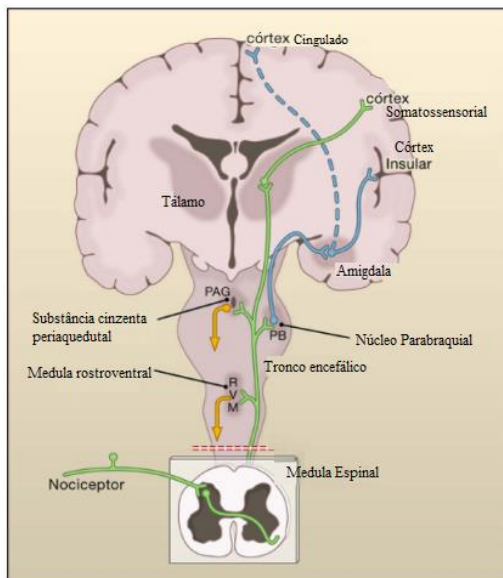


Figura 3. Anatomia da via da dor.

Os nociceptores aferentes primários transmitem informações nocivas aos neurônios de projeção dentro do corno dorsal da medula espinal. Um subconjunto desses neurônios de projeção transmite informação ao córtex somatossensorial via tálamo, fornecendo informações sobre a localização e intensidade do estímulo doloroso. Outros neurônios enviam suas projeções ao córtex insular e cingulado através de conexões no tronco encefálico (núcleo parabraquial) e amígdala, contribuindo para o componente afetivo da experiência da dor. Essa informação ascendente também acessa neurônios da medula rostroventral e substância cinzenta periaquedutal para acionar sistemas de feedback descendentes que regulam a saída da medula espinal (adaptado de Basbaum *et al.*, 2009).

Nosso organismo também possui mecanismos descendentes de controle da dor, que influenciam de modo a facilitar ou inibir a transmissão da mensagem nociceptiva ao nível da medula espinal

(Basbaum *et al.*, 2009). A via descendente para o controle da dor envolve uma série de estruturas encefálicas, tais como o córtex cerebral, hipotálamo, amígdala, *locus coeruleus* (LC), substância cinzenta periaquedutal (PAG), entre outros, bem como sistemas de neurotransmissores, dentre os quais podemos citar os sistemas opióidergicos, serotoninérgico, noradrenérgico, gabaérgico, adenosinérgico, além de canabinóides, entre outras substâncias (Millan, 2002; Yoshimura & Furue, 2006). A transmissão da informação nociceptiva pode ainda ser regulada negativamente por interneurônios inibitórios, que fazem sinapses na substância gelatinosa liberando neurotransmissores e neuromoduladores tais como o ácido γ -aminobutírico (GABA), opióides endógenos e glicina (Millan, 1999).

1.2 SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL: CONTEXTO HISTÓRICO

A primeira descrição documentada da Síndrome da Dor Complexa Regional (SDCR) foi um relatório feito pelo cirurgião francês Ambroise Paré, no século XVII, o qual descreveu contraturas e dores persistentes experienciadas pelo rei Charles IX após um procedimento de sangria (Pare, 1634 *apud* Dommerholt, 2004). Contudo, foi Silas Weir Mitchell (Figura 4), considerado o pai da neurologia, quem deu a primeira descrição detalhada de SDCR em 1864 (Lau & Chung, 2004).

Mitchell foi o médico que dedicou os primeiros anos de sua carreira ao cuidado de soldados que sofriam de dor em queimação secundária a ferimentos por armas de fogo, durante a Guerra Civil Americana (Iolascon *et al.*, 2015). Entre as doenças descritas com precisão por Mitchell estava uma síndrome caracterizada por dor crônica em queimação localizada distalmente ao local de lesão do nervo periférico e associado a distúrbios cutâneos (Mitchell *et al.*, 1864). Mitchell empregou o termo causalgia do grego “*Kausis*” (fogo) + “*Algos*” (dor) a esta condição (Mitchell, 1872). Sua descrição continua sendo uma das melhores a respeito da apresentação clínica da SDCR até hoje.

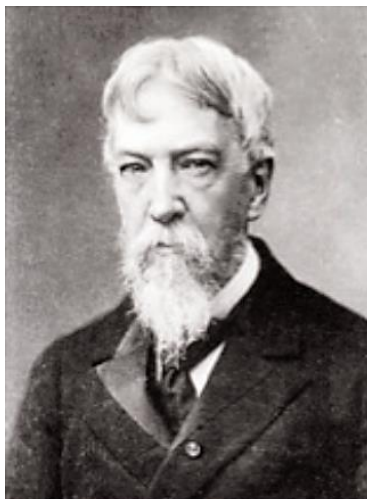


Figura 4. Silas Weir Mitchell (1829 – 1914).

Em 1900, durante o 29º Congresso da Sociedade Alemã de Cirurgia, o médico Paul Sudeck descreveu complicações de trauma nos membros, caracterizadas por dor resistente à terapia, edema e limitações da função motora (Sudeck, 1900). Durante muitos anos, a síndrome foi referida como atrofia de Sudeck, especialmente em países europeus. Outros nomes que foram utilizados incluem causalgia, síndrome da dor pós-traumática, artrose dolorosa pós-traumática, distrofia de Sudeck, edema pós-traumático, distrofia reflexa, distrofia simpático-reflexa (DSR), síndrome do ombro-mão, edema traumático crônico, algodistrofia entre outros (Dommerholt, 2004).

Em 1916, um cirurgião militar de Estrasburgo durante a Primeira Guerra Mundial sugeriu que a causalgia era causada pela exacerbação da atividade simpática, realizando, inclusive, a primeira simpatectomia periarterial para tratamento deste paciente (Iolascon *et al.*, 2015). Em 1946, James A. Evans introduziu o termo DSR para esta condição (Sebastin, 2011). Evans teorizou que o trauma que gerava atividade em aferentes simpáticos configurava um reflexo na medula espinal que estimulava a atividade em eferentes simpáticos e, por sua vez, resultou em alterações distróficas na periferia do membro (Evans, 1946). Essa teoria ganhou aceitação porque alguns pacientes tiveram alívio da dor após anestesia local ou com bloqueio farmacológico do gânglio

simpático (Rho *et al.*, 2002). No entanto, estudos recentes não conseguiram demonstrar um arco reflexo e sugerem que o sistema nervoso simpático pode não estar envolvido em todos os casos da síndrome (Harden, 2000). Por exemplo, em 1986, Roberts usou o termo “dor simpaticamente mantida” (DSM) para descrever a síndrome, enquanto Campbell e colegas usaram o termo “dor simpaticamente independente” (DSI) para aqueles pacientes com lesões nervosas que não respondiam ao bloqueio simpático (Stanton-Hicks, 2000). O uso de diferentes termos com classificações imprecisas e patogênese pouco clara levou a confusão, diagnósticos errados e mal tratamento de pacientes com esta doença (Griep, 2000).

A fim de dirimir esses problemas, em 1993 a IASP designou uma força tarefa para revisar a nomenclatura e desenvolver critérios diagnósticos da síndrome (Sebastin, 2011), os quais foram publicados em 1994 (Cordon e Lemonica, 2002). A equipe internacional de especialistas concordou com o termo síndrome de dor complexa regional (Janig e Stanton-Hicks, 1996). Como Stanton-Hicks e colaboradores (1995) explicaram, o termo SDCR foi escolhido por algumas razões:

- *Síndrome* indica que os sinais e sintomas da SDCR são uma série de eventos distintos correlacionados;
- *Dor* é essencial para o diagnóstico da síndrome. A dor pode ser espontânea ou evocada, como alodínia¹ ou hiperalgesia²;
- *Complexa* expressa as variadas características clínicas dentro de uma única pessoa ao longo do tempo, bem como as características de inflamação e alterações autonômicas, cutâneas, motoras e distróficas;
- *Regional* reflete que a maioria dos casos envolvem uma determinada região do corpo, muito embora a dor possa expandir para além da área da lesão inicial.

¹ - Dor evocada por um estímulo inócuo (que normalmente não provocaria dor).

² - Aumento na dor provocada por um estímulo nocivo.

1.3 DESCRIÇÃO E DIAGNÓSTICO

O termo SDCR descreve uma série de condições dolorosas que são caracterizadas por uma dor persistente (espontânea e /ou evocada) de membro, que é aparentemente desproporcional em tempo e grau ao curso normal de qualquer trauma conhecido ou outra lesão (Sebastin, 2011), sendo acompanhadas por uma ampla variedade de distúrbios autonômicos e motores em uma alta combinação de variáveis (Borchers & Gershwin, 2014). A dor presente nesta síndrome se apresenta de forma regional - não em um dermatomo ou território nervoso específico - e geralmente tem um predomínio distal de alterações sensoriais, motoras, sudomotoras³, vasomotoras e /ou tróficas (Harden *et al.*, 2007).

Vários testes podem auxiliar no processo de diagnóstico diferencial da síndrome, tais como: exames de raios-X, termografia, medições do fluxo sanguíneo periférico por laser Doppler, testes quantitativos de suor, testes sensoriais quantitativos, avaliação da resposta cutânea simpática, teste de força muscular (Cepeda *et al.*, 2002; Stanton-Hicks, 2000), porém não existe um teste diagnóstico padrão-ouro para a SDCR, portanto, o diagnóstico baseia-se inteiramente na avaliação de critérios clínicos e em diagnóstico de exclusão (Borchers & Gershwin, 2014). De acordo com a versão mais atual da “*Síndrome da dor complexa regional: diagnóstico prático e diretrizes de tratamento (4ª edição)*”, publicada pela IASP, os critérios clínicos para diagnóstico da SDCR estão inseridos na tabela 1.

³ - Referente a inervação simpática sobre as glândulas sudoríparas.

Tabela 1. Critérios clínicos para diagnóstico da SDCR.

1) Dor contínua, que é desproporcional a qualquer evento incitante.
2) Deve <u>informar</u> pelo menos um <u>sintoma</u> * em três das quatro seguintes categorias: <ul style="list-style-type: none"> • Sensorial: relatos de hiperalgesia e/ou alodínia; • Vasomotor: relatos de assimetria de temperatura e / ou alterações da cor da pele e/ou assimetria da cor da pele; • Sudomotor / Edema: relatos de edema e/ou alterações de sudorese (hiperidrose); • Motor/Trófico: relatos de diminuição da amplitude de movimento e/ou disfunção motora (fraqueza, tremor, distonia) e / ou alterações tróficas (cabelo, unha, pele).
3) Deve <u>exibir</u> pelo menos um <u>sinal</u> * <u>no momento da avaliação</u> em duas ou mais das seguintes categorias: <ul style="list-style-type: none"> • Sensoriais: Evidência de hiperalgesia (ao pinçar) e/ou alodínia (ao toque leve e/ou à pressão somática profunda e/ou movimento articular); • Vasomotor: Evidências de assimetria de temperatura e/ou alterações na cor da pele e/ou assimetria; • Sudomotor / Edema: evidência de edema e/ou alterações de sudorese (hiperidrose); • Motor / Trófico: evidência de diminuição da amplitude de movimento e / ou disfunção motora (fraqueza, tremor, distonia) e / ou alterações tróficas (cabelo, unha, pele).
4) Não haver outro diagnóstico que explique melhor os sinais e sintomas.

* - Lembrando que a diferença entre sinal e sintoma está na base de que *sintoma* corresponde a qualquer alteração da percepção normal que o paciente tem de seu próprio corpo, podendo ou não consistir um início de doença; já *sinal* expressa todas as características clínicas avaliadas por outrem.

Geralmente, a SDCR acomete uma extremidade do corpo (Tajerian *et al.*, 2014), mas também pode ter seu início simultâneo em dois e, muito raramente, três ou mais membros (Veldman *et al.*, 1993; Rijn *et al.*, 2011),

podendo iniciar após um trauma - fratura distal, lesão nervosa, constrição do membro, síndromes de compressão nervosa, lesão pós-cirúrgica (Feliu e Edwards, 2010).

Historicamente, três estágios progressivos da SDCR têm sido citados como importantes na identificação e no seu tratamento (Takats, 1937; Bonica, 1953; Schwartzman & McLellan 1987), mas a existência de tais estágios sequenciais é uma tradição clínica, uma teoria não comprovada baseada na experiência de certos autores, ao invés de resultados de estudos científicos específicos (Harden *et al.*, 2013), muito embora ainda existam autores que utilizam estes estágios para classificar a SDCR (Tajerian & Clark, 2016, Eberle *et al.*, 2009). Contrariamente à tradição dos estágios progressivos sequenciados no tempo, a análise científica sugeriu a possível existência de três subtipos de SDCR estatisticamente distintos: 1) uma síndrome com predominância de sinais vasomotores; 2) uma síndrome com dor neuropática / anormalidades sensoriais predominantes; e 3) uma síndrome semelhante às descrições clássicas da DSR (Bruehl *et al.*, 2002).

A SDCR é subdividida em dois tipos:

- Tipo I, antigamente conhecida como distrofia simpático-reflexa, a qual desenvolve-se após um trauma periférico sem apresentar lesão nervosa;
- Tipo II, uma vez conhecida como causalgia, apresenta os mesmos sinais e sintomas do tipo I, porém é distinguida pela identificação de lesão em um grande nervo (como por exemplo o nervo Mediano ou Isquiático) (Lohnberg & Altmaier, 2013).

A maior diferença entre o tipo I e II é uma lesão de nervo demonstrável neste último, a qual pode ser identificada por eletromiografia (EMG) e teste de velocidade de condução nervosa (VCN) (Bussa *et al.*, 2015). Neste trabalho iremos abordar a manifestação do tipo I da síndrome.

As figuras 5 e 6 mostram exemplos da apresentação clínica da síndrome nos membros superiores e nos membros inferiores, respectivamente.

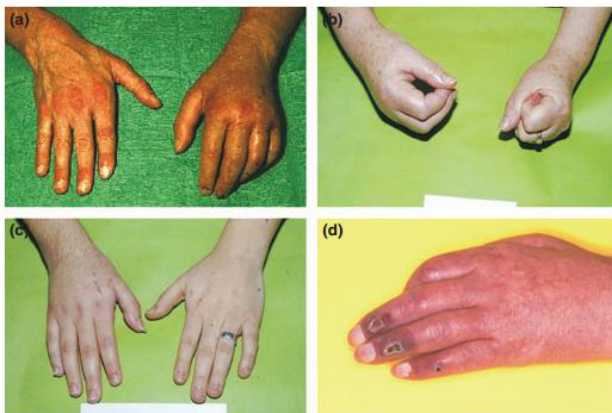


Figura 5. Sinais clínicos em membros superiores em pacientes com SDCR.

(A) Edema, alteração da coloração da pele e comprometimento da função da mão esquerda após fratura distal do rádio. (B) Edema e mobilidade prejudicada na tentativa de flexionar os dedos da mão direita após cirurgia de liberação do túnel do carpo. (C) Hipertricose da mão direita. (D) Contraturas, alteração da coloração e distúrbios tróficos da pele (Extraído de Maihofner *et al.*, 2010, com autorização do autor).



Figura 6. Sinais clínicos em membros inferiores em pacientes com SDCR.

(A) Hiperemia, edema e hiperidrose em membro inferior direito. (B) Alteração na coloração da pele no membro inferior direito. (C) Distonia relacionada a SDCR no tornozelo e pé esquerdo com flexão plantar e inversão do tornozelo e flexão dos dedos, edema e hipertricose também são visíveis (modificado de Marinus *et al.*, 2011, com autorização do autor).

1.4 EPIDEMIOLOGIA

A incidência da SDCR-I é incerta (Marinus *et al.*, 2011), e, até o momento, não existem estudos epidemiológicos mostrando a sua incidência no Brasil. Todavia, estudos demonstram uma incidência de 5,46 casos para cada 100.000 habitantes/ano nos EUA (Drummond, 2010) e 26,2 para cada 100.000 habitantes/ano na Holanda (De Mos *et al.*, 2007). A síndrome pode ocorrer em qualquer idade, mas é relativamente rara na infância e na adolescência (Sandroni *et al.*, 2003; De Mos *et al.*, 2007), com pacientes pediátricos constituindo < 10% dos afetados (Tan *et al.*, 2008). A incidência aumenta com a idade até os 70 anos de idade, e é 3-4 vezes mais prevalente em mulheres do que em homens (De Mos *et al.*, 2007). Em adultos, os membros superiores são mais afetados que os membros inferiores, sendo fraturas, contusões, entorses e cirurgias os eventos precipitantes mais comuns para desenvolvimento da síndrome (Bussa *et al.*, 2015). A taxa de resolução varia muito entre os estudos, entre 74% no primeiro ano a 36% dentro de 6 anos (Sandroni *et al.*, 2003). No entanto, o tempo de resolução é de difícil interpretação, uma vez que os estudos populacionais são bastante heterogêneos, inconsistentes nos seus critérios diagnósticos e não há um consenso sobre o que define recuperação (Marinus *et al.*, 2011).

1.5 FISIOPATOLOGIA

Ainda não se sabe todo o mecanismo fisiopatológico da SDCR-I (Saltık *et al.*, 2016; Birklein & Schlereth, 2015; Borchers & Gershwin, 2014; Field, 2013), contudo este parece ser multifatorial (Bussa *et al.*, 2015). O mecanismo que contribui para a SDCR-I difere de paciente para paciente, e muda inclusive no mesmo paciente ao longo do tempo (Bussa *et al.*, 2015). Há uma série de mecanismos diferentes aceitos e documentados na literatura (Goh *et al.*, 2017; Tajerian & Clark, 2016; Shah & Kirchner, 2011). Neste trabalho, vamos dar enfoque à característica isquêmica e inflamatória da síndrome.

1.5.1 ISQUEMIA-REPERFUSÃO

Como mencionado anteriormente, uma das formas de gênese da SDCR-I é por constrição do membro. A isquemia-reperfusão (IR), é um

processo de constrição do membro pelo qual desenvolveremos futuramente o modelo experimental para estudo da síndrome.

As lesões causadas por isquemia-reperusão são caracterizadas por uma privação inicial do fluxo sanguíneo para os tecidos/órgãos, seguido por subsequente restauração da perfusão e concomitante reoxigenação (Gorsuch *et al.*, 2012). De fato, uma ampla gama de processos patológicos contribui para lesão tecidual associada a IR (para revisão ver Eltzschig & Eckle, 2011). Um desequilíbrio na oferta e demanda metabólica dentro do órgão isquêmico resulta em profunda hipóxia tecidual e disfunção microvascular (Eltzschig & Eckle, 2011), o qual está associada com uma disfunção da barreira celular endotelial (Ogawa *et al.*, 1990) devido a diminuições na atividade da adenilato ciclase (AC) (enzima amplificadora que transforma ATP em AMPc) e níveis intracelulares de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (importante molécula que atua como segundo mensageiro na transdução de sinal celular) e um aumento concomitante na permeabilidade vascular (Ogawa *et al.*, 1992).

Ainda, a IR promove ativação de programas de morte celular, os quais podem ser categorizados como necrose, apoptose ou morte celular associada à autofagia (vacuolização citoplasmática com perda de organelas) (Hotchkiss *et al.*, 2009). A necrose, caracterizada por inchaço de células e organelas com subsequente ruptura de membranas superficiais e extravasamento de seu conteúdo intracelular (Hotchkiss *et al.*, 2009), é um resultado frequente de isquemia e reperusão (Eltzschig & Eckle, 2011). As células necróticas são altamente imunoestimuladoras e conduzem à infiltração de células inflamatórias e à produção de citocinas (Eltzschig & Eckle, 2011). Em contraste, a apoptose envolve uma cascata de sinalização orquestrada por caspases que induz uma morte celular programada, caracterizado pelo encolhimento da célula e seu núcleo, com integridade da membrana plasmática persistindo até o final do seu processo (Hotchkiss *et al.*, 2009).

A restauração do fluxo sanguíneo para um órgão isquêmico é essencial para prevenir danos irreversíveis aos tecidos (Halladin *et al.*, 2015), entretanto, paradoxalmente, a reperusão - embora necessária para reverter o quadro isquêmico - piora as lesões já presentes no período de isquemia (Silveira & Yoshida, 2004). A formação de quantidades excessivas de radicais livres (RL), principalmente pelo sistema xantina oxidase, associado à intensa participação dos neutrófilos, amplifica a reação inflamatória, com consequente edema, necrose e agravamento das condições clínicas teciduais (Zimmermann & Granger 1992; Yoshida, 1996).

1.5.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO: SENSIBILIZAÇÃO CENTRAL E PERIFÉRICA

O processo inflamatório ocorre como uma resposta do tecido à lesão celular e caracteriza-se por um fenômeno complexo e dinâmico, podendo manifestar-se a partir de qualquer agente lesivo, seja esse físico (queimadura, radiação, trauma), biológico (microorganismo, reações imunológicas) ou químico (Carvalho & Lemônica, 1998).

A sensibilização periférica resulta de alterações associadas à inflamação da fibra nervosa (McMahon *et al.*, 2008). Assim, o dano tecidual é muitas vezes acompanhado pelo acúmulo de fatores endógenos liberados de nociceptores ativados ou células não neurais que residem ou se infiltram na área lesada (incluindo mastócitos, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos) (Basbaum *et al.*, 2009). Além disso os macrófagos e neutrófilos, bem como as células teciduais lesadas, liberam uma variedade de substâncias oxidantes e enzimas criando um estresse oxidativo, no qual espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) e nitrogênio são produzidas em abundância, promovendo a indução de um grande número de fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF-κB), dímero fos-jun e AP-1, bem como perda dos estoques energéticos celulares, rompimento de mitocôndrias com liberação de enzimas líticas, lipoperoxidação e destruição de membranas e dano no ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*) (Carvalho & Lemônica, 1998).

Coletivamente, estes fatores endógenos, conhecidos como "sopa inflamatória", representam uma grande variedade de moléculas sinalizadoras que incluem: neurotransmissores, peptídeos (substância P (SP), peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP, do inglês *Calcitonin Gene-Related Peptide*), bradicinina), eicosanoides e lipídios relacionados (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, endocanabinóides), neurotrofinas, citocinas, quimiocinas, bem como proteases extracelulares (Basbaum *et al.*, 2009). Notavelmente, os nociceptores expressam um ou mais receptores de superfície celular capazes de reconhecer e responder a cada um destes agentes pró-inflamatórios ou pró-álgicos (Figura 7). Tais interações aumentam a excitabilidade da fibra nervosa, aumentando assim a sua sensibilidade à temperatura e/ou ao toque (Basbaum *et al.*, 2009).

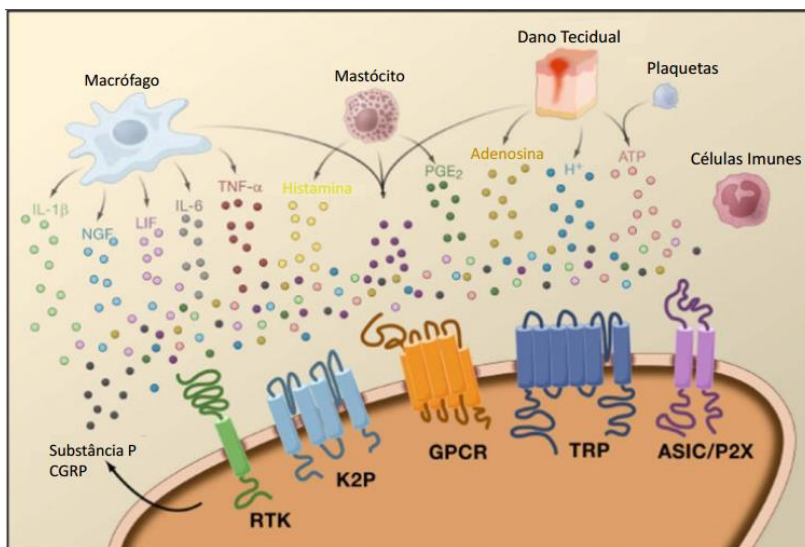


Figura 7. Mediadores periféricos da inflamação.

Os danos nos tecidos provocam a liberação de mediadores inflamatórios por nociceptores ativados ou por células não neuronais que residem ou se infiltram na área lesada, incluindo mastócitos, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos. Esta "sopa inflamatória" de moléculas de sinalização inclui serotonina, histamina, glutamato, adenosina tri fosfato (ATP), adenosina, SP, CGRP, bradicinina, eicosanóides, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, endocanabinóides, fator de crescimento do nervo (NGF, do inglês *Nerve Growth Factor*), Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α , do inglês *Tumor Necrosis Factor Alpha*), interleucina 1 β (IL-1 β) e proteases extracelulares. Estes fatores agem diretamente sobre o nociceptor por ligação a um ou mais receptores de superfície celular, incluindo receptores acoplados a proteína G (GPCR), canais TRP (do inglês *transient receptor potential*), canais iônicos sensíveis a ácidos (ASIC), canais de potássio de dois poros (K2P) e receptores de tirosina quinases (RTK), como representado no terminal do nociceptor periférico (modificado de Basbaum *et al.*, 2009).

Deste modo, a lesão primária desencadeia uma resposta inflamatória no local, que por sua vez provoca hipersensibilidade e dor, a qual visa favorecer o reparo tecidual. No entanto, em algumas situações como ocorre na SDCR-I a dor perde sua característica protetora e adquire um caráter de doença crônica e prejudicial. Com a persistência do processo inflamatório e a estimulação repetida/sustentada dos nociceptores ocorrem alterações neurológicas no sistema nervoso

central (SNC) e periférico (SNP), e, consequentemente, as respostas subsequentes aos estímulos são amplificadas deixando de refletir essencialmente a presença de um estímulo nocivo periférico (Basbaum *et al.*, 2009).

De fato, é observado na clínica que pacientes com SDCR-I apresentam aumentos significativos da concentração de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) tanto no local da lesão, quanto no plasma sanguíneo e no líquido cefalorraquidiano (De Mos *et al.*, 2009; Okudan & Celik, 2006). Tem sido postulado que o perfil de citocinas pró-inflamatórias representa um fator crucial na patogênese da SDCR-I (Uceyler *et al.*, 2007), uma vez que a interação dos mediadores inflamatórios com os seus canais específicos em neurônios aferentes leva a uma liberação de neuropeptídeos (SP e CGRP), perpetuando esta inflamação neurogênica (Marinus *et al.*, 2011). A estimulação repetida/sustentada destes nociceptores periféricos acaba por sensibilizá-los, processo conhecido como sensibilização periférica.

É importante ressaltar ainda que a SP e o CGRP, entre outros neuropeptídeos, não são liberados apenas periféricamente, mas também nos terminais de nociceptores centrais, desempenhando um importante papel na indução e manutenção da sensibilização central (Seybold, 2009), a qual veremos a seguir.

Segundo o quadro de taxonomias da IASP, sensibilização central refere-se ao aumento da responsividade de neurônios nociceptivos no SNC para sua entrada aferente normal ou sublimiar. Ou seja, é uma amplificação da sinalização neural dentro do SNC que provoca hipersensibilidade à dor (Woolf, 2011). Realmente, este processo contribui para a cronificação da dor em uma variedade de distúrbios e doenças, incluindo a SDCR-I (para revisão ver Woolf, 2011).

Os mecanismos de sensibilização central não estão completamente compreendidos, mas podem envolver a desinibição dos neurônios nociceptivos espinais ou a facilitação da atividade nociceptiva por neurônios excitatórios que se projetam a partir da medula rostroventral (Vera-Portocarrero *et al.*, 2006). Mudanças semelhantes ocorrem em estruturas envolvidas nos aspectos emocionais da dor, como na amígdala, no giro cingulado anterior e no córtex pré-frontal (Fu *et al.*, 2008; Pedersen *et al.*, 2007) e estas alterações podem representar um substrato para mudanças cognitivas e de humor (Costigan *et al.*, 2009). O processo de sensibilização parece distorcer ou suprimir sensações não nocivas (Marinus *et al.*, 2011). A perda de uma influência inibitória das sensações cutâneas normais no membro afetado pela SDCR-I pode aumentar a

excitabilidade das redes nociceptivas tálamo-corticais, criando assim um círculo vicioso (Davis *et al.*, 1996).

Um evento chave na sensibilização central, e na subsequente geração de hipersensibilidade à dor, é a liberação de neurotransmissores excitatórios na medula espinal (Bauer *et al.*, 2009), bem como a ativação e suprarregulação de receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA), sensíveis ao glutamato, que aumentam a transmissão do sinal nociceptivo da medula espinal ao córtex cerebral (Kuner, 2010). Deste modo, neurônios nociceptivos sensibilizados da medula espinal se tornam mais responsivos à entrada de *inputs* periféricos e podem, inclusive, disparar na ausência destes sinais (Marinus *et al.*, 2011). Assim sendo, a sensibilização central pode, então, causar dor crônica, hiperalgesia e alodínia, bem como a disseminação de dor para áreas adjacentes não lesadas (Woolf & Thompson, 1991).

Este conjunto de fatores favorece que ocorram alterações corticais mal adaptativas, tema do próximo tópico.

1.5.3 PLASTICIDADE CORTICAL MAL ADAPTATIVA

Del Valle e colaboradores (2009) citam que a presença de dor crônica em indivíduos depende de alterações estruturais e funcionais no SNC, e que estas alterações são particularmente importantes em pessoas com SDCR-I. Uma manifestação da disfunção do SNC em pacientes com SDCR-I é o comprometimento da função motora. A função motora comprometida é comum após a maioria das lesões, mas geralmente há uma resolução quando o paciente se recupera. Entretanto, alguns pacientes com SDCR-I desenvolvem distúrbios de movimento acentuados (Marinus *et al.*, 2011). De fato, Birklein e colaboradores (2000) citaram que sintomas motores como reflexos tendinosos exagerados, distonia, mioclonia, paresia e tremor – alterações consideradas dependentes em grande parte pela disfunção do SNC – têm sido identificados em um grande número de pacientes com SDCR-I. A distonia, o transtorno de movimento mais prevalente na SDCR-I, é caracterizada por posturas de flexão persistente e sustentada do punho e dedos no membro superior, e por flexão plantar e inversão do pé no membro inferior, como representado na figura 6C (Van Hilten *et al.*, 2001). Esta disfunção é uma característica típica da plasticidade neuronal mal adaptativa (Rijn *et al.*, 2007).

Além do amplo espectro de disfunções físicas já citadas, os pacientes com SDCR-I também apresentam expressivos problemas nas funções superiores de alta ordem/complexidade. Já foi descrito na

literatura que pacientes que sofrem com SDCR-I há algum tempo, tendem a perceber que seu membro afetado é maior do que realmente é (Moseley, 2005), relatando distorções da imagem corporal – como por exemplo, percepções alteradas na forma, postura e temperatura de todo ou de partes do membro (Lewis *et al.*, 2007). Em consonância aos achados clínicos, técnicas de imagem funcional mostraram uma reorganização no mapa somatotópico no córtex somatossensorial primário (S1) contralateral ao membro afetado em pacientes com SDCR-I (Figura 8).

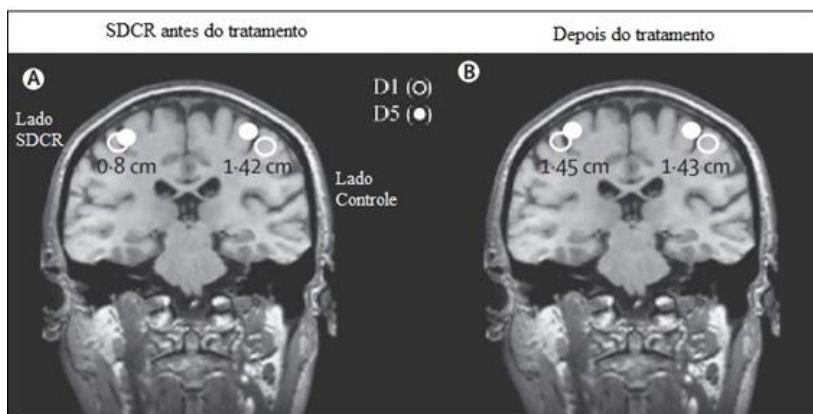


Figura 8. Reorganização cortical e plasticidade mal adaptativa em um paciente com SDCR-I.

Neste caso a mão esquerda foi afetada. (A) A representação da extensão cortical da mão (distância entre o primeiro dedo - D1, círculos abertos - e o quinto dedo - D5, círculos preenchidos) se mostrou diminuída de 1,42 cm no lado saudável para 0,8 cm no lado afetado. As alterações somatotópicas correlacionaram-se com a dor da doença. (B) Normalização da somatotopia no giro pós-central um ano após a terapia bem-sucedida (modificado de Maihofner *et al.*, 2004).

A extensão da representação cortical da mão no córtex somatossensorial primário estava reduzida no lado lesado em comparação com o lado saudável, sendo correlacionada a extensão destas alterações com a hiperalgesia mecânica e intensidade da dor na síndrome (Maihofner *et al.*, 2004). Com a redução destes sintomas após o tratamento, esta reorganização cortical S1 também se inverteu.

Além disto, já foi reportado na literatura que sequelas psicológicas, incluindo depressão, ansiedade, medo do movimento e medo de dano/re-lesão, são comuns devido à dor constante, perdas sociais e emocionais (Jong *et al.*, 2011). Ante o exposto, o próximo tópico versará sobre

importantes comorbidades emocionais como a ansiedade e depressão que estão associadas a SDCR, temática que permeará o desenvolvimento do trabalho.

1.6 ANSIEDADE E DEPRESSÃO

Estudos epidemiológicos sugerem que a dor pode ser um indicador de risco para o início do transtorno depressivo e ansiedade (Asmundson & Katz, 2009; Hilderink *et al.*, 2012), embora ainda hoje se saiba pouco sobre as especificidades de tal relação (Gerrits *et al.*, 2014). De fato, os distúrbios de depressão e ansiedade são altamente prevalentes nas pessoas que sofrem com dores (Asmundson & Katz, 2009). E a combinação de ansiedade, depressão e dor leva a uma redução da qualidade de vida (Gerrits *et al.*, 2015). Estudos mostram que há uma correlação negativa entre a qualidade de vida e dor, ansiedade e depressão, ou seja, quanto maior a intensidade desses sintomas, pior é a qualidade de vida dos indivíduos (Capela *et al.*, 2009). Além disso, ansiedade e depressão podem resultar em aumento da dor ao longo do tempo (Campbell *et al.*, 2003).

A depressão tem sido relacionada com disfunções de neuroplasticidade e sobrevivência celular e com a diminuição de número e tamanho de células nervosas no hipocampo (Manji *et al.*, 2001). A persistência da doença e a falta de tratamento adequado podem favorecer a diminuição gradual do volume hipocampal, que por sua vez, pode explicar os problemas de memória de alguns pacientes, e também vários outros sintomas do transtorno (Aan *et al.*, 2009). Dentre os vários sintomas que podem acompanhar essa disfunção, destacamos a anedonia, a qual se caracteriza pela perda da capacidade de sentir prazer, própria de estados gravemente depressivos. Recentemente novas pesquisas mostraram que a redução de fatores de crescimento, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *Brain Derived Neurotrophic Factor*), pode estar envolvida na gênese da depressão (Drzyzga *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2015) e da ansiedade (Suliman *et al.*, 2013).

1.7 FATORES NEUOTRÓFICOS

As neurotrofinas são uma família de proteínas que promovem a diferenciação e sobrevivência neuronal bem como participam da modulação da transmissão e plasticidade sináptica (Fortunato *et al.*, 2009). São sintetizadas no retículo endoplasmático e posteriormente são

clivadas em moléculas que ainda podem sofrer modificações, até finalmente acabar em vesículas secretoras (Perito & Fortunato, 2012).

Os fatores neurotróficos medeiam várias funções celulares através da ativação de receptores, incluindo a expressão dos genes que estão integralmente envolvidos na regulação da neuroplasticidade. A neuroplasticidade envolve diferentes processos (formação dendrítica, remodelação sináptica, potenciação de longa duração (LTP), desenvolvimento axonal, e neurogênese), auxiliando nas adaptações encefálicas frente à diversos estímulos (Manji *et al.*, 2003; Varandas, 2003).

O BDNF tem se mostrado crucial na regulação da atividade sináptica e plasticidade, tanto através de mudanças funcionais e estruturais nos neurônios (Waterhouse & Xu, 2009). Pesquisas têm mostrado que a depleção de fatores neurotróficos, principalmente o BDNF, pode resultar em comportamento tipo-depressivo em animais e pode induzir atrofia ou perda celular que são semelhantes às aquelas observadas em pacientes com depressão (Duman, 2004; Murakami *et al.*, 2005).

Ainda o BDNF parece ser imprescindível para o crescimento celular, pois permite a plasticidade sináptica ao longo da vida, desempenhando um papel importante na sobrevivência celular (Calabrese *et al.*, 2009; Leßmann & Brigadski, 2009). Estudos realizados em tecidos *post-mortem* revelaram que a diminuição da concentração de BDNF promove perda celular e progressiva redução do volume hipocampal e de estruturas límbicas (Schmidt *et al.*, 2008), provocando disfunções cognitivas e de memória em pacientes, bem como outros sintomas (Aan *et al.*, 2009), mostrando que este fator neurotrófico está envolvido nos mecanismos de memória.

1.8 MEMÓRIA

Os diversos tipos de memória constituem mecanismos capazes de conservar durante breves ou longos períodos, os mais variados tipos de informação (Izquierdo, 2004). Sabemos que há muitas classificações para as memórias, considerando sua função, conteúdo e tempo de duração.

A memória espacial é um tipo de classificação em relação à função da memória, e ela armazena informações sobre o ambiente e a orientação espacial. Este tipo de memória é utilizado para navegar em torno de um ambiente familiar, ao mesmo passo que a navegação espacial é utilizada por roedores em teste em labirintos, por exemplo, nos quais os

animais devem aprender a localização de alimentos em determinados espaços dentro desses labirintos. A memória espacial tem representações dentro da memória de trabalho, memória de curta duração e memória de longa duração. A memória de curta duração é assim chamada pois permanece disponível para evocação por um curto período de tempo (minutos a horas) após a sua aquisição. Já as memórias de longa duração podem ser evocadas em dias, semanas ou anos após serem formadas e requerem síntese proteica para sua consolidação (McGaugh, 2000).

No hipocampo são armazenadas informações sobre o meio espacial formando os chamados mapas espaciais (O'Keefe & Dostrovsky, 1971; Squire, 1992). Disfunções nessa região resultam, dentre outros problemas, em déficits de memória espacial (como, por exemplo, dificuldade de lembrar a localização de lugares) (Hebert & Dash, 2004).

Estudos clínicos mostraram evidências de que pacientes com SDCR-I apresentam expressivos problemas cognitivos como déficits de atenção, de aquisição e consolidação de novas memórias (Libon *et al.*, 2010). De fato, Weiner e colaboradores (2006) observaram também que dores crônicas estão associadas à redução do desempenho em testes neuropsicológicos que avaliam a memória, a linguagem e controle executivo. De forma semelhante, segundo Cardoso-Cruz e colaboradores (2013), o mais prevalente entre os problemas cognitivos que afetam comumente pacientes com síndromes de dores crônicas são queixas de falhas de memória.

Estes distúrbios já são amplamente descritos na literatura científica e são reconhecidos hoje por constituir um problema confinado aos processos de memória de curto prazo que requerem um grau significativo de complexidade cognitiva (Buhle & Wager, 2010; Apkarian *et al.*, 2011). Na prática experimental, estudos recentes em modelos de dor em animais demonstraram que ela induz disfunções cognitivas em diferentes processos (Moriarty *et al.*, 2011; Cardoso-Cruz *et al.*, 2013), tais como: aquisição de informação espacial (Cardoso-Cruz *et al.*, 2011) e de memória de reconhecimento (Millecamps *et al.*, 2004). Todavia, apesar de toda esta informação, ainda não foi verificado se na SDCR-I também ocorre déficit na memória espacial e quais mecanismos poderiam estar envolvidos.

1.9 TRATAMENTO DA SDCR-I

Por ser uma doença complexa, não existe um protocolo padrão para o tratamento da SDCR-I (Cordon & Lemonica, 2002), porém alguns

estudos citam a importância do seu início precoce, de modo a promover a utilização da extremidade afetada e reduzir o risco de cronificação da dor (Gaspar & Antunes, 2011; Freedman *et al.*, 2014), deste modo o tratamento deve ser multidisciplinar e multiprofissional, devido aos vários componentes envolvidos na doença (Cordon & Lemonica, 2002; Field, 2013).

Segundo alguns autores (Birklein & Maihöfner, 2006; Gaspar & Antunes, 2011), os principais objetivos do tratamento são:

- Informar / educar o paciente;
- Promover a utilização do membro afetado;
- Minimizar a dor / evitar cronificação;

As modalidades de tratamento incluem:

- Fisioterapia / Terapia Ocupacional;
- Tratamento farmacológico;
- Agentes físicos;
- Bloqueios simpáticos;
- Neuromodulação;
- Terapia cognitivo-comportamental;
- Tratamento psicológico.

A educação do paciente tem como objetivo fornecer informações de como evitar o medo usando os sintomas, crenças e comportamentos dos pacientes. Os pacientes são ensinados a ver seus vários distúrbios autonômicos e vasomotores como uma condição que pode ser auto gerenciada, ao invés de uma doença pela qual o membro afetado precisa de proteção cuidadosa (Freedman *et al.*, 2014). Sob a supervisão do terapeuta, o paciente identifica situações perigosas e ameaçadoras e aumenta gradualmente a exposição a essas atividades tanto quanto possível até que os níveis de ansiedade tenham diminuído (Jong *et al.*, 2005).

Dentro das modalidades de tratamento previamente citadas, discorreremos brevemente sobre as principais delas:

1.9.1 FISIOTERAPIA

A imobilidade é um fator perpetuador da sintomatologia da síndrome e, assim, mobilizar desde cedo a extremidade afetada, visando manter as amplitudes articulares, se faz necessário (Gaspar & Antunes, 2011). Neste sentido, já está bem descrito na literatura o importante papel da fisioterapia no tratamento do SDCR-I (Baron & Wasner, 2001; Perez *et al.*, 2010; Palmer, 2015). Os objetivos da fisioterapia em pacientes com

SDCR-I são: minimizar o edema, dessensibilizar o membro doloroso e normalizar as sensações ao toque, promover o posicionamento normal do membro, diminuir a proteção muscular e aumentar o uso funcional da extremidade (Freedman *et al.*, 2014), bem como restaurar os circuitos cerebrais fisiológicos (Birklein & Schlereth, 2015). O processamento nociceptivo é conhecido por ser influenciado pelo input visual (Gallace *et al.*, 2011; Haggard *et al.*, 2013). Quando os pacientes olham para o próprio corpo, suas respostas neurais aos estímulos dolorosos são reduzidas e eles relatam que a intensidade da percepção da dor é diminuída - fenômeno chamado analgesia visualmente induzida (Gierthmühlen *et al.*, 2014). Moseley (2006) cita que um programa de tratamento mais elaborado, inclui restaurar a percepção corporal, fazendo o paciente reconhecer as mãos direita e esquerda, utilizando para isso diferentes técnicas, como por exemplo a terapia do espelho e a imagens motoras graduadas (IMG). Esta última atua na reorganização de redes corticais presumivelmente envolvidas na dor crônica e na SDCR-I (Freedman *et al.*, 2014).

1.9.2 FARMACOTERAPIA

Existem muitas opções de medicação para o tratamento de SDCR-I, porém, para a maioria delas, há uma escassez de evidências/estudos científicos devidamente controlados e randomizados que provem o seu benefício (Gaspar & Antunes, 2011; Freedman *et al.*, 2014). Na fase inicial, como já foi exposto, predominam os fenômenos inflamatórios periféricos, e, neste sentido, o uso de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) parece ter efeitos positivos na melhoria da sintomatologia local (Gaspar & Antunes, 2011). Alguns estudos mostraram a utilidade de corticosteroides nesta fase, embora o seu benefício continue a ser controverso (Quisel *et al.*, 2005; Bianchi *et al.*, 2006; Salibi *et al.*, 2014).

Para a analgesia, podem ser usados analgésicos não opióides, opióides e alguns fármacos coadjuvantes, como antidepressivos tricíclicos (como amitriptilina e nortriptilina) (Rowbotham, 2006) e anticonvulsivantes (carbamazepina, gabapentina, pregabalina, etc.) (Vusse *et al.*, 2004; Rowbotham, 2006; Freedman *et al.*, 2014).

1.9.3. TERAPIA COGNITIVO-COMPORTAMENTAL

Como já mencionado, a IASP descreve a dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual

real ou potencial, ou descrita em termos de tais danos. Esta definição baseia-se no conceito de dor como uma percepção e não como uma modalidade puramente sensorial, e leva em conta o fato de que para que a dor seja conscientemente vivida, o processamento cognitivo é necessário (Moriarty *et al.*, 2011). Assim, numa perspectiva clínica, tratar a dor vai muito mais além do que controlar a nocicepção (Chapman, 2005). O processamento central de estímulos nocivos inclui a construção de modelos emocionais e cognitivos de resposta à dor (Chapman, 2005). É neste contexto que a intervenção psicológica pode ser fundamental na abordagem da SDCR-I (Gaspar & Antunes, 2011).

Nesse sentido, uma abordagem ao tratamento psicológico para a dor crônica é a terapia cognitivo-comportamental (TCC) focada no controle de sensações de dor, pensamentos relacionados à dor e emoções negativas (Bussa *et al.*, 2015).

A figura 9 mostra um resumo da fisiopatologia e as opções de tratamento para cada sinal e sintoma da síndrome.

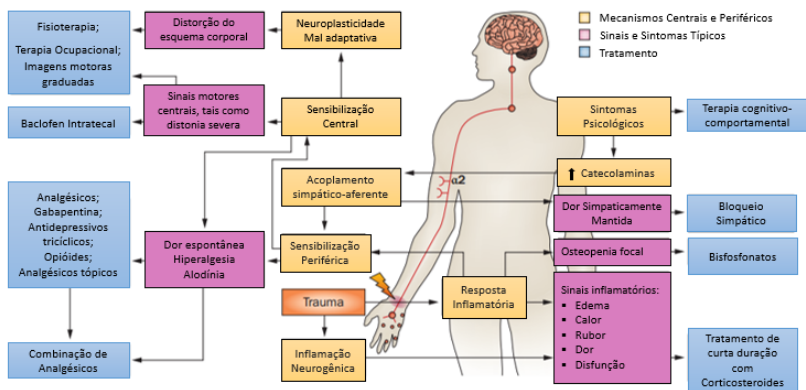


Figura 9. Fisiopatologia e opções de tratamento na SDCR-I.

A interação entre os mecanismos periféricos e centrais na SDCR-I (caixas amarelas), levam a uma multipla gama de diferentes sinais e sintomas típicos (caixas roxas), as quais podem orientar a seleção de opções de tratamento (caixas azuis). O início do SDCR-I é geralmente precedido por um trauma – como, por exemplo, uma fratura do rádio - que resulta em uma resposta inflamatória e inflamação neurogênica, a qual pode induzir uma osteopenia focal. A libertação de citocinas da região inflamada leva à sensibilização periférica, a qual posteriormente gera sensibilização central e neuroplasticidade mal adaptativa, resultando em sintomas motores centrais e distúrbios do esquema corporal. O acoplamento simpato-aferente produz dor simpaticamente mantida. Estresse psicogênico pode resultar em aumento da liberação de catecolaminas, que pode gerar e agravar ainda mais a dor (Adaptado de Gierthmühlen *et al.*, 2014).

1.10 MODELO EXPERIMENTAL DA SDCR-I

A utilização de animais como modelo de estudo e transposição para a fisiologia humana teve início com as pesquisas do médico fisiologista Claude Bernard, por volta de 1865. Seu trabalho “Introdução ao Estudo da Medicina Experimental” procurou estabelecer regras e princípios para o estudo experimental nas ciências médicas. Ele provocou situações físicas e químicas que resultavam em alterações nos animais semelhantes às doenças em humanos (Fagundes & Taha, 2004). Dessa maneira, demonstrou a aplicabilidade da experimentação animal aos humanos.

Hoje em dia os modelos animais podem ser utilizados em todos os campos da pesquisa biológica (Ferreira *et al.*, 2005; Russel, 2001). Tratando-se de modelos experimentais, torna-se importante a conceituação de doença animal, que é aquela cujos mecanismos patológicos são suficientemente similares àqueles de uma doença humana, atuando assim como modelo (Ferreira *et al.*, 2005). Esse modelo animal, obrigatoriamente, deve permitir a avaliação de fenômenos biológicos naturais, induzidos ou comportamentais, que possam ser comparados aos fenômenos humanos em questão (Ferreira & Ferreira, 2003).

Neste sentido, um critério importante para o desenvolvimento de modelos animais envolve estabelecer a validade do modelo como uma verdadeira representação do processo a ser estudado. Geralmente, três tipos de parâmetros de validade são aplicados a modelos animais: validade de face, validade preditiva e validade de constructo (Bourin *et al.*, 2007). Sendo assim Kumar e colaboradores (2013) elucidam que:

- Validade de Face implica que a resposta observada no modelo animal deve ser semelhante às respostas comportamentais e fisiológicas observadas em seres humanos;
- Validade Preditiva implica, por exemplo, que o modelo deve ser sensível a agentes farmacológicos eficazes na clínica;
- Validade de Constructo relaciona-se com a similaridade entre a fundamentação teórica que permeia o modelo animal ao comportamento humano.

Sabe-se, por exemplo, que camundongos e humanos compartilham mais de 90% de seus genes (Kumar *et al.*, 2013). Além disso, modelos animais são especialmente importantes em situações em que, por questões éticas ou protocolares, o ser humano não pode ser utilizado.

Dessa forma, vários são os estudos que buscam encontrar novas formas de compreender a fisiopatologia de doenças que afetam o ser humano. Assim, modelos experimentais nas suas diversas formas – *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* e também *in silico* – têm sido empregados na prática científica a fim de fornecer os subsídios que promovam não só a correta compreensão da doença, como também o desenvolvimento de terapias para amenizá-las.

Coderre e colaboradores (2004) criaram um modelo experimental *in vivo* em ratos – e posteriormente adaptado para camundongos - o qual mimetiza as principais características relacionadas à SDCR-I - tais como ausência de lesão nervosa e danos locomotores

aparentes, o qual nomearam de dor pós isquemia crônica (DPIC). O método envolve colocar um torniquete no tornozelo do animal. Para isto, o animal é previamente anestesiado e um anel de borracha é colocado próximo à articulação do tornozelo durante um período de 3 h, a fim de produzir uma interrupção do fluxo sanguíneo para a pata. Decorrido o período de isquemia, o anel é cortado permitindo a reperusão do membro e obtendo, assim, os danos lesivos por IR. Os animais exibem, então, hiperemia local com extravasamento plasmático e posterior surgimento de hiperalgesia a estímulos mecânicos nocivos e térmicos ao frio, bem como alodínia mecânica a estímulos inócuos no membro afetado (Coderre *et al.*, 2004). Portanto, este modelo apresenta as validades de face, preditiva e de constructo, desempenhando um importante papel na coleta de informações que nos possibilitam compreender melhor os mecanismos envolvidos na patogênese da SDCR-I, bem como investigar possíveis intervenções terapêuticas.

Como já citado ao longo do trabalho, a manifestação clínica da SDCR-I se dá em qualquer idade, não sendo restrita a uma determinada faixa etária. Desta forma, neste trabalho optamos por realizar o protocolo experimental com camundongos em duas idades diferentes: 6 e 12 meses (os quais serão denominados de adultos jovens e meia idade, respectivamente), a fim de observarmos a repercussão físico-comportamental da síndrome nessas idades distintas.

2 JUSTIFICATIVA

Embora a dor seja a queixa mais comum de pacientes com dores crônicas, há uma ampla gama de comorbidades associadas, tais como: comprometimentos cognitivos (McCracken & Iverson, 2001), déficits de memória (Schnurr & Macdonald, 1995), depressão (Fishbain *et al.*, 1997) e ansiedade (Dersh *et al.*, 2002; McWilliams *et al.*, 2003). Estes acometem mais de 50% de pacientes com dores crônicas (Gerriets *et al.*, 2014) acabando por prejudicar a qualidade de vida e a resposta ao tratamento (Bromley *et al.*, 2013). Além disso, fatores psicológicos como depressão e ansiedade podem resultar em aumento da dor ao longo do tempo (Campbell *et al.*, 2003).

Já se sabe que as citocinas pró-inflamatórias têm um papel importante na indução de dor em diferentes processos e, não diferentemente, elas também têm um papel importante na SDCR-I. Sabemos também que as citocinas interferem negativamente inibindo a LTP em outros modelos animais, prejudicando assim, a cognição e memória, bem como diminuindo as concentrações de BDNF hipocampais.

Embora a fisiopatologia da SDCR-I não esteja completamente compreendida (Saltik *et al.*, 2016), o SNP, SNC, bem como fatores psicológicos e genéticos parecem estar envolvidos (Marinus *et al.*, 2011). Porém, apesar de todo o conhecimento adquirido nos últimos anos, ainda não está claro como a dor e inflamação afetam estas funções cognitivas superiores, as quais são cruciais em processos mnemônicos complexos.

Sabemos que o hipocampo é uma estrutura encefálica chave no processamento mnemônico, influenciando não só em questões de formação de memórias, como também em aspectos emocionais, como ansiedade e depressão. Assim, encontrar fatores que auxiliem no entendimento de como lesões periféricas influenciam em processos cognitivo-emocionais na SDCR-I se fazem importantes. Nesse sentido, este estudo visa avaliar quais as disfunções cognitivo-emocionais podem ser geradas em um modelo animal da SDCR-I; observar se haverá déficit de memória espacial e avaliar a participação do hipocampo e medula espinal nessas desordens. Tendo em vista o crescente corpo de evidências demonstrando que a liberação de mediadores inflamatórios de neurônios aferentes (inflamação neurogênica) desempenha um papel significativo na etiologia desta síndrome (Schinkel *et al.*, 2006), este estudo também visa verificar a participação da citocina TNF- α e da neurotrofina BDNF nessas possíveis disfunções em camundongos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar o perfil cognitivo-emocional de camundongos submetidos ao modelo experimental da Síndrome da Dor Complexa Regional tipo I.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Avaliar as respostas comportamentais no modelo experimental da SDCR-I paralelamente em camundongos adultos jovens (6 meses) e de meia idade (12 meses) nos seguintes parâmetros:

- i) Avaliar o comportamento de nocicepção (alodínia mecânica e hiperalgisia térmica ao frio);
- ii) Avaliar a espessura (edema) e temperatura da pata;
- iii) Avaliar o comportamento emocional de ansiedade e depressão;
- iv) Avaliar a memória espacial;
- v) Verificar a atividade locomotora;
- vi) Avaliar as concentrações de citocina pró-inflamatória (TNF- α) e neurotrofina (BDNF) no hipocampo e medula espinal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para a realização deste trabalho foram utilizados 100 camundongos C57BL/6 machos com 6 e 12 meses de idade (pesando entre 25-35g), provenientes do Biotério Setorial do Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) localizado no Campus Reitor João David Ferreira Lima, Florianópolis, SC. Os animais foram mantidos no biotério do LANDI, Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB, em estantes ventiladas (ALESCO) contendo no máximo 10 animais por caixa, com ventilação, sob condições controladas de temperatura ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (60% - 80%) em ciclos claro-escuro de 12 horas (6 às 18 horas). A água se manteve filtrada com filtro Jojaco[®] para coliformes fecais e metais pesados, e a dieta foi constituída de ração comercial (BioBase para roedores) de forma *ad libitum*.

Para a realização dos estudos comportamentais, os animais foram aleatoriamente distribuídos entre grupos e mantidos no laboratório por pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA/UFSC, protocolos nº PP00745 e 7564100417), estando de acordo com o guia de cuidados de animais de laboratório e guia ético para investigações experimentais da dor em animais conscientes (Zimmermann, 1983).

Ressalta-se que todos os procedimentos foram executados de maneira a preservar ao máximo a integridade física dos animais, tendo como princípio reduzir ao máximo o sofrimento eventualmente causado, porém, necessário para a demonstração da efetividade do modelo proposto.

4.2 INDUÇÃO DA LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO DA PATA

O método para reprodução da SDCR-I foi padronizado por Coderre e colaboradores (2004) em ratos, e posteriormente adaptado para camundongos (Millecamps *et al.*, 2010). Neste trabalho seguiremos modelo outrora realizado por Bratti (2011), com algumas modificações. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de hidrato de cloral (7%, 0,6 mL/kg) (Quintão *et al.*, 2006). Após a verificação da perda do estado de consciência do animal - através do pinçamento da cauda e

das pregas interdigitais, cinco anéis elásticos de 1,2 mm de diâmetro interno (Elástico Ligadura 000-1237 Uniden – Figura 10) foram colocados de forma proximal à articulação do tornozelo do membro posterior direito, de modo a fazer um torniquete na região durante 3 horas. Durante este tempo o animal foi mantido anestesiado com reforço de 20% do volume inicial de hidrato de cloral caso iniciasse o despertar. Transcorrido o tempo de oclusão da pata, o elástico foi cortado, permitindo a reperfusão sanguínea no membro. Após este procedimento os animais observados pelo experimentador até retornarem a deambular pela caixa-moradia, retornando, posteriormente, para o biotério do LANDI (Figura – 11). Os camundongos falsos lesionados receberam os mesmos procedimentos, com exceção que os anéis foram cortados de modo que eles apenas permaneceram frouxamente ao redor do tornozelo, sem causar oclusão de algum vaso sanguíneo.



Figura 10. Anéis elásticos.

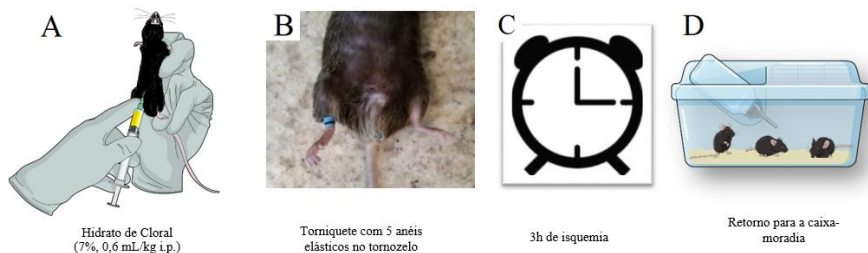


Figura 11. Esquema do protocolo de lesão por isquemia-reperfusão da pata.

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de hidrato de cloral (7%, 0,6 mL/kg) (A), após verificação do estado de consciência, cinco anéis elásticos foram posicionados no tornozelo do membro inferior direito (B) durante um período de 3h (C). Após este tempo os anéis foram retirados e os animais retornaram para suas caixas-moradia (D).

4.3 AVALIAÇÃO DOS SINAIS

Os experimentos foram conduzidos em sala ampla, com ruídos externos reduzidos, no período claro do dia (entre 8 e 18h).

4.3.1 MENSURAÇÃO DA ESPESSURA (EDEMA) DA PATA

Para mensurar a espessura da pata, utilizou-se um micrômetro externo digital 0-25 mm (Micrômetro Externo Digital 02, 0005 Zaas Precision – Figura 12) posicionando a parte fixa na superfície dorsal e a parte móvel do micrômetro na superfície plantar central, sendo realizada uma medida na pata traseira direita dos animais. O edema foi então representado pela diferença entre a medida da pata do grupo que recebeu o torniquete (DPIC) e a medida da pata do grupo que não o recebeu (falso lesionado) ao longo do tempo.



Figura 12. Micrômetro Digital.

4.3.2 MENSURAÇÃO DA TEMPERATURA DA PATA

A diferença de temperatura da pata foi verificada através da comparação da temperatura média da pata do grupo que recebeu o torniquete (DPIC) e a medida da pata do grupo que não o recebeu (falso lesionado). Para isso, aferiu-se a temperatura da superfície dorsal da pata traseira direita de cada animal com a utilização de um termômetro digital (Mallory modelo: Thermosensor Pro – Figura 13), de forma triplicata, fazendo-se uma média dos valores obtidos.



Figura 13. Termômetro Digital.

4.3.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA NOCICEPTIVA NA PATA: TESTE DE VON FREY

Para avaliar a alodínia mecânica nos camundongos, usou-se o teste de von Frey de acordo com o método *up & down* modificado por Chaplan e colaboradores (1994). Brevemente, os camundongos foram aclimatados durante 30 minutos em compartimentos individuais de acrílico (9 cm x 7 cm x 11 cm) sobre uma plataforma de malha de arame fenestradas e elevadas à uma altura de 30 cm, para permitir acesso à superfície ventral da pata traseira direita (Figura 14 A). Filamentos de von Frey (0,02; 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1,4; 2,0; 4,0; 8,0 gramas; VFH, Stoelting, Chicago, EUA – Figura 14 B) foram aplicados verticalmente sobre a superfície plantar do membro posterior direito até o filamento curvar-se ligeiramente. O primeiro filamento a ser usado foi o de 0,4g e a força do próximo filamento foi diminuída ou aumentada de acordo com a resposta de retirada da pata (Hervera *et al.*, 2010).

A frequência de resposta de retirada foi medida após 6 aplicações (duração média de 1s cada) dos filamentos de von Frey, tendo o limiar de resposta calculado utilizando o programa Microsoft Excel®. O número de retiradas da pata foi registrado e expresso por uma percentagem de 50% do limiar de retirada da pata.



Figura 14. Avaliação da nocicepção da pata.

(A) camundongo sobre a plataforma fenestrada, (B) filamentos de von Frey e (C) representação da avaliação álgica mecânica através da aplicação de tensão na superfície plantar da pata com os filamentos.

4.3.4 AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE TÉRMICA AO FRIO: TESTE DA PLACA FRIA

Para avaliar a hipersensibilidade térmica ao frio utilizou-se o teste da placa fria (Caixa quente – frio MOD. AVS-CQF, São Paulo, Brasil – Figura 15) conforme descrito anteriormente por Mika *et al.*, (2015), com algumas modificações. Os animais foram colocados individualmente em um aparato de acrílico (12 x 20 x 10 cm³) sobre uma placa resfriada continuamente à $5 \pm 1^\circ \text{C}$, com tempo de corte de 120s. A hipersensibilidade térmica ao frio foi avaliada pela latência de retirada da pata traseira direita.

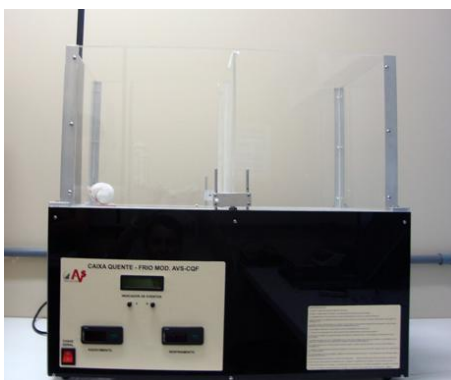


Figura 15. Placa Fria.

4.3.5 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL

Para mensurar o peso corporal total utilizou-se uma balança digital (SF-400) antes dos testes realizados. O peso (g) foi então representado pela diferença do peso corporal dos animais que receberam o torniquete (DPIC) e dos que não receberam (falso lesionado) ao longo do tempo.

4.3.6 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO RELACIONADO À ANSIEDADE: TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Para a avaliação dos comportamentos relacionados à ansiedade foi utilizado o labirinto em cruz elevado (LCE), o qual consistiu de dois braços abertos (25 cm x 5 cm), em frente um ao outro e perpendiculares a dois braços fechados (25 cm x 5 cm x 15 cm) com uma plataforma central (5 cm x 5 cm) (Figura 16). O aparato encontrava-se elevado a 50 cm do chão. Durante o procedimento experimental a sala experimental foi iluminada com lâmpada vermelha. Inicialmente, cada animal foi colocado cuidadosamente na plataforma central do labirinto de frente para um braço aberto. Durante o teste, foi permitido que os animais circulassem livremente sobre o labirinto durante 5 minutos. O número de entradas e tempo gasto no braço aberto e o número de entradas de braço fechado foram registrados manualmente ao longo de um período de 5 min. Uma entrada era registrada somente quando todas as quatro patas do animal estavam dentro do mesmo braço (fechado ou aberto). O número de entradas no braço fechado foi considerado como uma medida da atividade locomotora do animal no aparato (Rodgers & Johnson, 1995), e os índices de braço aberto foram expressos como porcentagem de tempo que o animal permaneceu no braço aberto (% Tempo BA) e porcentagem de entradas de braço aberto (% Entradas BA) usando a seguinte fórmula adotada por Verma & Jain (2016): $\% \text{ entradas no BA} = \frac{n^{\circ} \text{ entradas no BA}}{\text{total de entradas}} \times 100$ e $\% \text{ tempo no BA} = \frac{\text{permanência (s) no BA}}{300} \times 100$. Entre cada sessão de teste o aparato foi limpo com uma solução de etanol 30%.

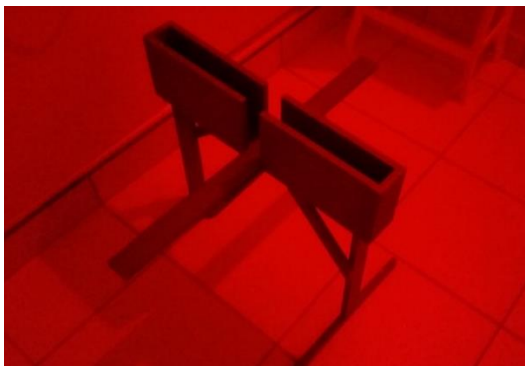


Figura 16. Labirinto em Cruz Elevado.

4.3.7 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO LOCOMOTORA: TESTE DO CAMPO ABERTO

O Campo Aberto (CA) é um teste utilizado para observar a atividade motora e comportamento exploratório geral (Mechan *et al.*, 2002). O aparato consiste em uma arena aberta feita de madeira lisa e consiste em uma área quadrada de 60 cm \times 40 cm \times 40 cm (Figura 17). Os animais foram colocados no centro do aparato e lhes foi permitido livre exploração durante 5 min. Uma câmara de vídeo localizada acima do aparato registrou o seu comportamento durante o teste para posterior análise. Os parâmetros de locomoção de distância total percorrida e velocidade máxima foram avaliados com o auxílio do software ANY-mazeTM.

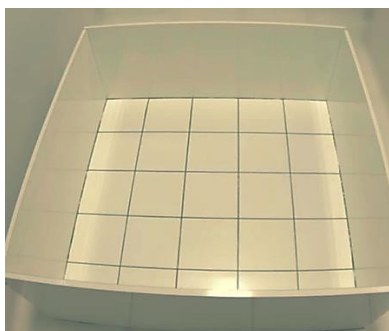


Figura 17. Campo Aberto.

4.3.8 AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA ESPACIAL: TESTE DO Y-MAZE MODIFICADO

O teste do Y-maze modificado foi utilizado para acessar a memória espacial dos animais, seguindo protocolo já realizado por Soares *et al.*, (2013), com pequenas modificações. A tarefa se baseia na preferência inata dos animais de explorar áreas que não foram previamente exploradas (Cognato *et al.*, 2010). O aparato consiste em um labirinto em forma de Y com três braços (50 cm x 10 cm x 40 cm) feito de madeira coberto com fórmica impermeável com uma angulação de 120° entre cada braço (Figura 18). O teste consistiu em dois ensaios - treino e teste, respectivamente - com duração de 5 min separados por um intervalo de 90 min entre cada ensaio (Soares *et al.*, 2013). Durante o treino, um braço (“novo”) foi bloqueado por uma porta removível, sendo o animal, então, colocado na extremidade de um braço, de face para o centro do aparato e lhe permitindo livre acesso aos dois braços livres. No final do treino o animal era removido do aparato e mantido em sua caixa-moradia durante o intervalo de 90 min. Durante o teste, o braço “novo” foi aberto e o animal foi, então, novamente colocado no braço de início e lhe é permitido explorar, agora, os três braços durante 5 min. O teste foi filmado, tendo o número total de entradas, % de entradas e % de tempo gasto em cada braço calculado posteriormente. Foi considerado entrada em um braço apenas quando os quatro membros do animal estivessem dentro do braço. O aparato foi limpo com etanol 30% entre cada ensaio/animal para evitar pistas olfativas.



Figura 18. Y-maze.

4.3.9 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO RELACIONADO À DEPRESSÃO

4.3.9.1 TESTE DE SUSPENSÃO DA CAUDA

O teste da suspensão da cauda foi realizado conforme já descrito por Steru e colaboradores (1985), com pequenas modificações. O teste visa submeter os camundongos a um estresse inevitável e inescapável de curto prazo - no caso o de ser suspenso pela sua cauda - e observar o tempo que os mesmos levam para desenvolver uma postura imóvel. A duração da imobilidade tem sido inferida como um índice de “desespero comportamental”, no qual longas durações de imobilidade implicam em maiores graus deste comportamento (Juszczak *et al.*, 2006), sendo este teste um modelo preditivo de estado “tipo-depressivo” (Gadotti *et al.*, 2012). Brevemente, os camundongos foram colocados em uma sala com controle de ruídos onde foram suspensos à 50 cm acima do chão por meio de uma fita adesiva colocada cerca de 1 cm a partir da ponta da cauda. O tempo de imobilidade foi gravado durante um período de 6 min. A figura 19 exemplifica os comportamentos de: (A) Imobilidade - o camundongo fica imóvel sem produzir quaisquer movimentos; (B) balançar - mantendo o seu corpo reto, o camundongo move as patas continuamente em uma posição vertical e/ou move o seu corpo de um lado para o outro; (C) *curling* - o animal realiza em movimentos de torção ativa do tronco. Os camundongos foram considerados imóveis somente quando não apresentaram mais movimentos ativos, sem realizar quaisquer movimentos corporais.

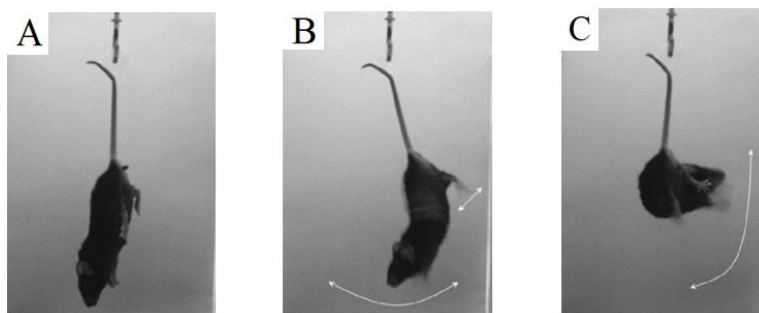


Figura 19. Imagens ilustrando os comportamentos obtidos no teste de suspensão da cauda.

(A) Imobilidade; (B) balançar e (C) *curling* (Adaptado de Berrocoso *et al.*, 2013).

4.3.9.2 *SPLASH TEST*

Este teste segue protocolo já realizado e descrito por Isingrini *et al.*, (2010), com pequenas modificações. Ele consistiu em borrifar 1mL de solução de 10% de sacarose no dorso do animal colocado individualmente em uma caixa limpa de acrílico (30 x 30 x 20 cm). Devido à sua viscosidade, a solução de sacarose adere ao pelo do animal e este exibe um comportamento de autolimpeza (grooming). Depois de aplicar a solução de sacarose, a frequência (tempo) e a latência para início do comportamento de grooming foram calculados durante 5 min de teste (Yalcin *et al.*, 2011) fornecendo indício de autocuidado e comportamento motivacional, considerados análogos a alguns sintomas de depressão (Moretti *et al.*, 2012), tal qual a perda da capacidade de sentir prazer (comportamento anedônico) (Malatynska *et al.*, 2012). O aparato foi limpo com uma solução de etanol 30% entre os testes a fim de eliminar pistas olfativas dos animais.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE TNF- α e de BDNF

As concentrações teciduais da citocina pró-inflamatória TNF- α e da neurotrofina BDNF foram quantificados através da técnica de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) no hipocampo e na medula espinal dos camundongos. Brevemente, 24 h após o último dia de experimento os animais foram eutanasiados por decapitação e os tecidos do hipocampo e medula espinal foram coletados e homogeneizados em Eppendorf de 1,5 mL (*Dounce, Tissue Grinders Omni International, Kennesaw, GA, EUA*) com uma solução PBS (Salina tamponada com fosfato) contendo Tween 20 (0,05%) fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 0,1 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10 mM, aprotinina 2 ng/mL, e cloreto de benzetônio 0,1 mM. Os homegenatos foram transferidos para Eppendorf e centrifugados a 3000 g durante 10 min a 4 °C. Os sobrenadantes obtidos foram armazenados a -80 °C até a análise. O conteúdo proteico total do sobrenadante foi mensurado pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando uma curva padrão de calibração com albumina de soro bovino (BSA) (0,05 a 0,5 mg/mL). As quantificações das mesmas foram realizadas através de kits ELISA de acordo com as recomendações específicas do fabricante R & D Systems (Minneapolis, MN, USA). As concentrações da citocina e da neurotrofina foram mensurados pela interpolação de uma curva padrão por mensuração colorimétrica a 450 nm (corrigidas pela subtração da leitura

a 550 nm) no leitor de placa Multileitora Infinite M200 TECAN e os valores finais foram expressos como pg/mg de proteína.

4.5 LINHA DO TEMPO DOS EXPERIMENTOS

A Figura 20 mostra o esquema experimental e cronologia dos procedimentos realizados nos camundongos.

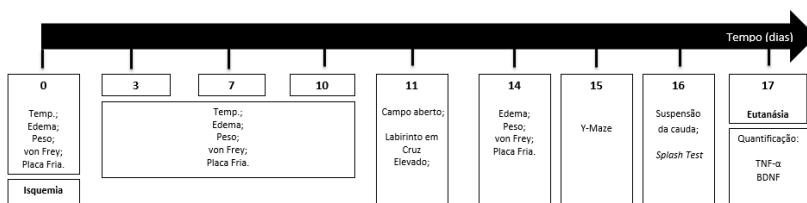


Figura 20. Design do protocolo experimental.

Camundongos C57BL/6 machos de 6 e 12 meses de idade foram submetidos ou não à uma lesão isquêmica da pata posterior direita para reprodução do modelo de SDCR-I e, após isto, foram conduzidos aos testes comportamentais conforme os dias descritos. Temp = temperatura.

4.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise estatística foi conduzida com o auxílio do programa Graph Pad Prism version 6 (GraphPad Software®, San Diego, CA, EUA). Para comparação entre os grupos foi utilizado a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni e pelo teste *t* de *student* não pareado. O nível de significância considerado em todas as análises foi de $P < 0,05$. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM).

5 RESULTADOS

A colocação de 5 anéis elásticos na articulação do tornozelo dos camundongos C57BL/6 machos adultos jovens (6 meses) e meia idade (12 meses), por um período de três horas, induziu um torniquete no tornozelo promovendo uma isquemia da pata, sendo a reperusão observada após os anéis serem cortados. Assim, a figura 21 mostra uma representação da pata dos camundongos antes, durante e após a IR. Desta maneira, observa-se o aspecto normal da pata do camundongo (Figura 21 A); o processo de isquemia gerado pelos cinco anéis elásticos posicionados na articulação do tornozelo (Figura 21 B); na figura 21 C, três dias após a lesão, observa-se o claro sinal de edema da pata gerado após o processo de IR; sete dias após a lesão, consegue-se observar que a pata do camundongo apresenta-se com rubor e bastante edemaciada (Figura 21 D).



Figura 21. Imagens representativas da pata de camundongos antes, durante e após a IR.

A: aspecto anterior à exposição ao torniquete; B: durante a IR (colocação dos cinco anéis elásticos na articulação do tornozelo); C: três dias após a IR, a pata encontra-se edemaciada; D: sete dias após a IR, a pata apresenta-se com rubor e bastante edemaciada.

5.1 EFEITOS DA IR SOBRE A ALODÍNIA MECÂNICA E HIPERSENSIBILIDADE TÉRMICA AO FRIO

Inicialmente, foi observado se o modelo utilizado neste trabalho era capaz de reproduzir as características clássicas da síndrome, como alodínia mecânica e hipersensibilidade térmica ao frio, edema e alteração de temperatura local. Assim, pode-se observar que os animais submetidos a IR apresentaram redução significativa do limiar de retirada da pata ao estímulo mecânico no teste dos filamentos de von Frey (caracterizando alodínia mecânica - Figura 22), bem como redução da latência de retirada da pata sob o estímulo térmico frio de 5 °C no teste da placa fria (caracterizando hipersensibilidade térmica ao frio - Figura 23) quando comparados com os animais do grupo falso lesionado. Na figura 22 A e B, observa-se que tanto os camundongos adultos jovens quanto os de meia idade do grupo DPIC desenvolveram marcada e significativa alodínia mecânica que pôde ser evidenciado do 3º ao 14º dia de avaliação quando comparado com o grupo falso lesionado. Os dados apresentados na figura 22 C mostram o delta (Δ) da resposta de alodínia mecânica, ou seja, a diferença entre a medida/mensuração final – e a medida/mensuração inicial no teste dos filamentos de von Frey. Assim, pode-se observar que o limiar de resposta de retirada de ambos animais adultos jovens e meia idade do grupo DPIC diminuiu de forma significativa e semelhantemente em comparação ao seu respectivo grupo falso lesionado. A diminuição significativa do limiar de retirada de da pata de ambos animais adultos jovens e meia idade do grupo DPIC em comparação ao seu respectivo grupo falso lesionado foi confirmado através da análise da área sob a curva correspondente ao decurso temporal de avaliação (Figura 22 D).

Já a figura 23, painéis A e B, mostram que tanto os camundongos adultos jovens quanto os de meia idade do grupo DPIC desenvolveram marcada e significativa redução da latência de retirada da pata ao estímulo de frio (5°C). Essa diferença significativa pôde ser observada no 3º e 7º dia, mas não no 10º e 14º dia, de avaliação nos animais adultos jovens do grupo DPIC quando comparados com o grupo falso lesionado. Interessantemente, essa resolução do quadro de hipersensibilidade térmica ao frio não pôde ser observada nos animais do grupo DPIC de meia idade, os quais mantiveram diferenças significantes entre os grupos no 3º até o 14º dia de avaliação. A diminuição significativa do limiar de retirada de da pata ao estímulo de frio (5°C) de ambos animais adultos jovens e meia idade do grupo DPIC em comparação ao seu respectivo

grupo falso lesionado foi confirmada através da análise da área sob a curva correspondente ao decurso temporal de avaliação (Figura 23 C).

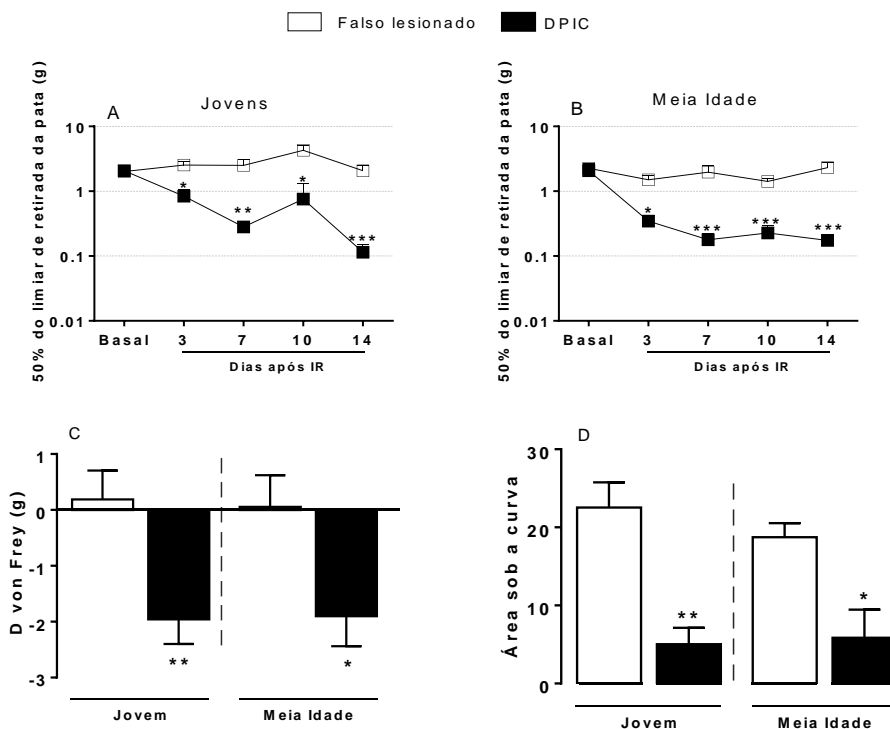


Figura 22. Alodínia mecânica na pata de camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).

Os resultados apresentados nos painéis A (camundongos adultos jovens) e B (camundongos adultos meia idade) mostram o perfil temporal de avaliações da alodínia mecânica – diminuição significativa no limiar de retirada da pata nos camundongos dos grupos DPIC em comparação a seus respectivos grupos falso lesionado nos dias de avaliação (3º, 7º, 10º e 14º). Os resultados do painel C demonstram o Δ com a diferença da última resposta – a primeira resposta dos animais, sendo observado uma redução do delta em ambos grupos DPIC dos camundongos adultos jovens e meia idade. O painel D apresenta a área sob a curva correspondente ao gráfico do decurso temporal avaliado nos painéis A e B. (DPIC: dor pós isquemia crônica; IR: isquemia e reperfusão da pata; Os dados apresentados representam a média de 10 a 11 animais por grupo e as linhas verticais indicam o EPM. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni

(Painel A e B) e pelo teste *t* de *student* não-pareado entre os grupos avaliados (Painel C e D). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparados ao respectivo grupo falso lesionado.

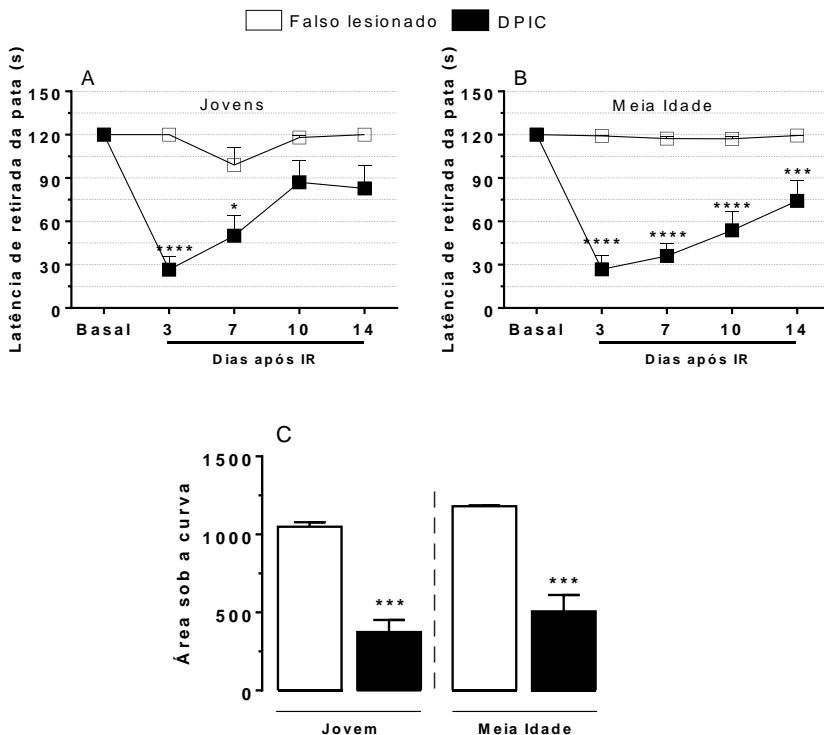


Figura 23. Hipersensibilidade térmica ao frio (5°C) na pata de camundongos com dor pós isquemia crônica (DPIC).

Os resultados apresentados no painel A e B (adultos jovens e meia idade, respectivamente) demonstram o perfil temporal da hipersensibilidade ao frio – os camundongos do grupo DPIC apresentaram redução na latência de retirada da pata ao estímulo térmico frio em comparação aos seus respectivos grupos falso lesionado nos dias de avaliação; o painel C apresenta a área sob a curva correspondente ao gráfico do decurso temporal avaliado (DPIC: dor pós isquemia crônica; IR: isquemia e reperfusão da pata). Os dados apresentados representam a média de 7 a 12 animais por grupo e as linhas verticais indicam o EPM. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni (Painel A e B) e pelo teste *t* de *student* não-pareado entre os grupos avaliados (Painel C). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ comparados ao respectivo grupo falso lesionado.

5.2 EFEITOS DA IR NO EDEMA E NA TEMPERATURA DA PATA

Os sinais locais de edema e hipertermia (temperatura) induzidos pela IR na pata também foram investigados. Avaliou-se o edema (mm) da pata dos animais que sofreram os danos pela IR (grupo DPIC), e os que não sofreram (falso lesionado). Os resultados apresentados na figura 24, painel A, mostram uma diferença estatística na espessura da pata no terceiro, sétimo e décimo dia nos camundongos adultos jovens submetidos à IR, quando comparados com o seu grupo falso lesionado. Todavia, este quadro se reverteu no décimo quarto dia após IR, onde não foi observada diferença significativa entre os grupos (Figura 24, painel A). Uma resposta semelhante foi observada nos camundongos de meia idade do grupo DPIC (Figura 24, painel B), os quais também apresentaram aumento significativo do edema na pata em comparação com o grupo falso lesionado, no terceiro, sétimo e décimo dia após IR. Interessantemente, este quadro não conseguiu ser revertido e a diferença do edema da pata continuou sendo observado no décimo quarto dia após IR, no grupo DPIC. Não foram encontradas diferenças estatísticas no Δ do edema dos grupos avaliados (painel C). O painel D demonstra a área sob a curva correspondente aos gráficos A e B do decurso temporal de avaliação do edema, onde conseguimos observar diferença estatística entre os camundongos submetidos à IR tanto nos adultos jovens quanto nos de meia idade.

Avaliou-se também a temperatura (°C) da pata dos camundongos que sofreram lesão por IR (grupo DPIC), e os que não sofreram (falso lesionado). Os resultados apresentados na figura 25, painel A, mostram que não houve diferença estatística entre a temperatura da pata dos grupos avaliados nos animais adultos jovens. Porém, observou-se diferença estatística na temperatura dos animais de meia idade do grupo DPIC, os quais obtiveram um acentuado aumento da temperatura da pata no terceiro e sétimo dia após a IR em comparação com o seu respectivo grupo falso lesionado. Esta diferença não é observada no décimo dia de avaliação. O painel C apresenta a área sob a curva referente ao decurso temporal avaliado nos painéis A e B. Podemos observar neste painel que houve uma diferença entre os grupos apenas nos camundongos de meia idade do grupo DPIC, mostrando que, aparentemente, a lesão foi mais agressiva neste grupo.

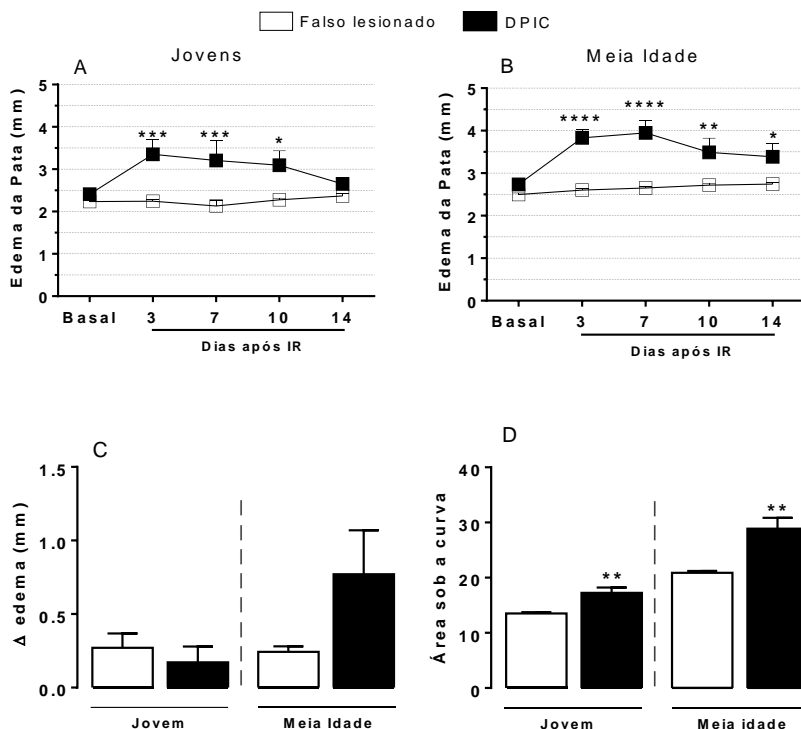


Figura 24. Edema da pata induzido pela IR em camundongos.

A espessura foi medida com micrômetro digital e o edema foi então representado pela diferença entre a medida da pata do grupo que recebeu o torniquete (DPIC) e a medida da pata do grupo que não o recebeu (falso lesionado). Os resultados apresentados no painel A demonstram o perfil temporal do edema dos animais adultos jovens – uma diferença estatisticamente significativa do edema da pata foi observada nos camundongos do grupo DPIC em comparação com os do grupo falso lesionado no terceiro, sétimo e décimo dia após IR, porém, este quadro se reverteu no 14º dia, onde não são mais vistas diferenças entre os grupos. No painel B observamos o mesmo perfil temporal de aumento do edema nos camundongos DPIC de meia idade em comparação com o seu respectivo grupo falso lesionado no terceiro, sétimo e décimo dia após IR, muito embora, este quadro não tenha sido revertido e a diferença estatística do edema permanece observável no 14º dia após IR. O painel C mostra o Δ do edema dos grupos avaliados, onde não foram encontradas diferenças estatísticas nos grupos avaliados. O painel D demonstra a área sob a curva correspondente ao gráfico do decurso temporal de avaliação do edema, o qual é possível observar a diferença estatística apenas entre os animais de meia idade (DPIC: dor pós isquemia crônica; IR: isquemia e reperfusão da

pata). Os dados apresentados representam a média de 7 a 11 animais por grupo e as linhas verticais indicam o EPM. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni (Painel A e B) e pelo teste *t* de *student* não-pareado entre os grupos avaliados (Painel C e D). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ comparados ao respectivo grupo falso lesionado.

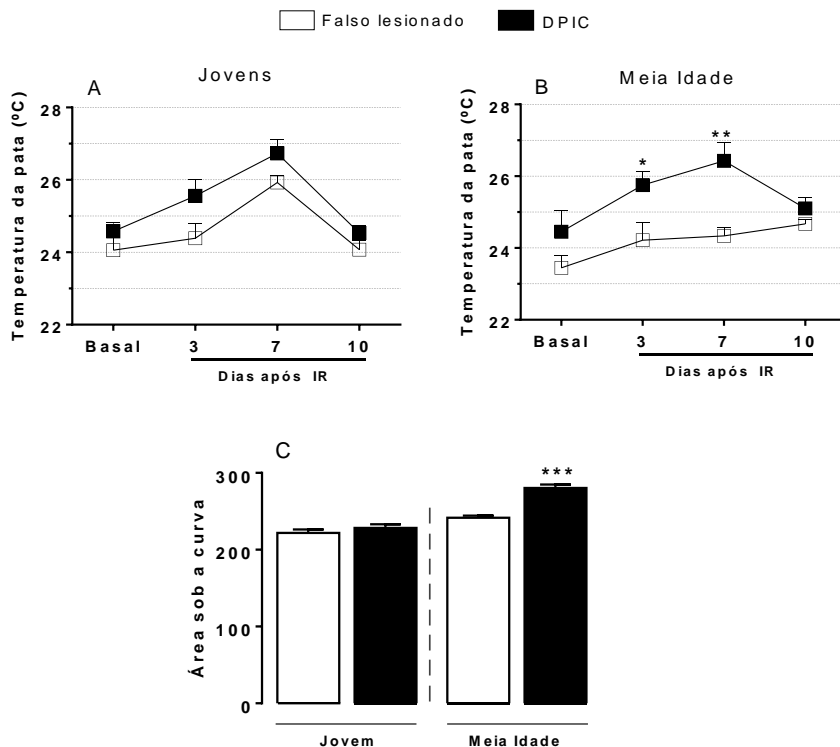


Figura 25. Aumento da temperatura da pata induzido pela IR em camundongos.

Os resultados apresentados nesta figura demonstram o perfil temporal das mensurações da temperatura da pata dos camundongos. Nos animais adultos jovens (Painel A), não foi observada diferenças estatísticas entre os animais que receberam o torniquete (DPIC) e os animais que não receberam (falso lesionado). Todavia, nos animais de meia idade (Painel B), foi observado um aumento da temperatura da pata no grupo DPIC em comparação ao seu grupo falso lesionado no terceiro e sétimo dia de avaliação, com a normalização da temperatura no décimo dia. O painel C demonstra a área sob a curva correspondente ao decurso temporal avaliado nos painéis A e B (DPIC: dor pós isquemia crônica; IR: isquemia e reperfusão da pata). Os dados apresentados representam a média de 7 a 12 animais por grupo e as linhas verticais indicam o EPM. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni (Painel A e B) e pelo teste *t* de *student* não-pareado entre os grupos avaliados (Painel C). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparados ao respectivo grupo falso lesionado.

5.3 EFEITOS DA IR NO PESO CORPORAL E ATIVIDADE LOCOMOTORA DOS ANIMAIS

A repercussão física corporal induzida pela IR da pata foi analisada através do tempo. Inicialmente, avaliou-se o peso corporal total dos camundongos antes e no terceiro, sétimo, décimo e décimo quarto dia após a lesão por IR. Os resultados apresentados na figura 26 demonstram que não houve diferença estatística no peso corporal entre os grupos avaliados nos camundongos adultos jovens (Figura 26, painel A) e meia idade (Figura 26, painel B) através dos dias avaliados.

A análise da diferença entre o peso final – o peso inicial (Δ do peso) não evidenciou diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 26, painel C). O painel D representa a área sob a curva referente ao decurso temporal avaliado nos painéis A e B.

A atividade locomotora dos animais foi avaliada através do teste do Campo Aberto (CA). Este teste foi escolhido a fim de verificar se os animais estariam com prejuízos motores e, assim, seriam prejudicados para realizar as próximas tarefas. Como pode ser observado na figura 27, não houve diferença significativa na distância percorrida (Figura 27, painel A) e velocidade máxima atingida (Figura 27, painel B) durante a realização do teste do CA nos grupos avaliados, atividades as quais avaliam a atividade locomotora dos animais.

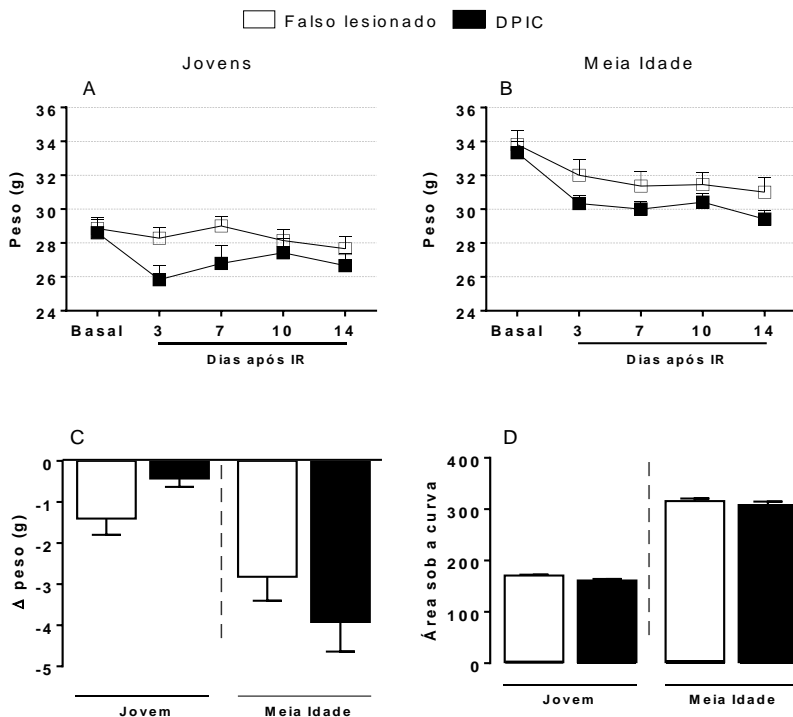


Figura 26. Peso corporal total dos camundongos.

O peso corporal total foi medido com uma balança digital eletrônica no início dos respectivos dias de avaliação. Os resultados apresentados nos painéis A e B demonstram o perfil temporal do peso corporal de camundongos adultos jovens e de meia idade, respectivamente. Não houve diferença estatística entre os grupos nos dias de avaliação; de forma semelhante, o painel C apresenta o Δ (delta), que informa a diferença entre o peso final – peso inicial, dos camundongos, demonstrando não haver diferença nesta medida; os resultados do painel D demonstram a área sob a curva correspondente ao gráfico do decurso temporal avaliado (DPIC: dor pós isquemia crônica; IR: isquemia e reperfusão da pata). Os dados apresentados representam a média de 7 a 12 animais por grupo e as linhas verticais indicam o EPM. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni (Painel A e B) e pelo teste *t* de *student* não-pareado entre os grupos avaliados (Painel C e D). * $p < 0,05$, comparados ao respectivo grupo falso lesionado.

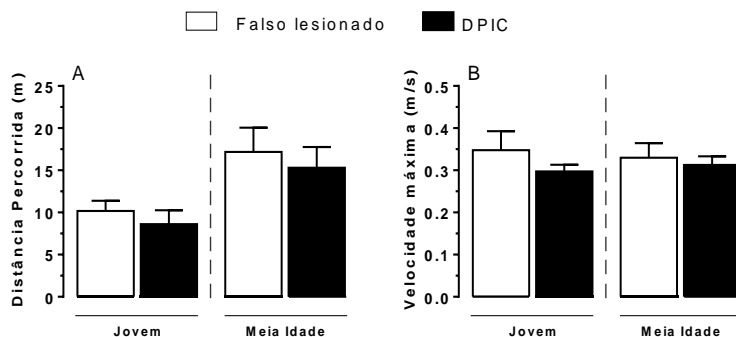


Figura 27. Atividade locomotora em camundongos avaliados no teste do Campo Aberto.

O painel A e B demonstram, respectivamente, que não houve diferença na distância percorrida e velocidade máxima entre os grupos avaliados no teste do campo aberto (DPIC: dor pós isquemia crônica). Os dados apresentados representam a média de 7 a 12 animais por grupo e as linhas verticais indicam o EPM. A análise estatística foi realizada por teste t de *student* não-pareado entre os grupos DPIC comparados aos seus respectivos grupos falso lesionados. $*p < 0,05$, comparado ao respectivo grupo falso lesionado.

5.4 EFEITOS DA IR SOBRE COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À ANSIEDADE

Depois de realizar os testes para observar se o modelo conseguiu reproduzir os sinais e sintomas da SDCR-I e avaliar que eles não apresentavam alterações locomotoras, realizamos outras avaliações comportamentais que têm como objetivo analisar as respostas cognitivo-emocionais dos animais, a fim de compreendermos as repercussões centrais desta lesão periférica. Assim, realizamos o teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) a fim de avaliar o comportamento tipo-ansioso.

A figura 28 mostra os resultados obtidos no teste do LCE. O painel A demonstra que o número de entradas nos braços fechados (BF) dos camundongos de meia idade do grupo DPIC foi significativamente menor em comparação ao seu respectivo grupo falso lesionado, o que denota uma menor mobilidade desses animais no teste. O painel B demonstra que houve diferença estatística na porcentagem de entradas nos braços abertos (BA), nas quais ambos os camundongos adultos jovens e de meia idade do grupo DPIC obtiveram um menor número de entradas nesses braços em comparação aos seus respectivos grupos falso lesionado. O painel C corrobora os achados anteriores, onde ambos camundongos adultos jovens e de meia idade do grupo DPIC permaneceram uma menor porcentagem de tempo nos braços abertos. Esses achados sugerem um perfil tipo-ansioso dos camundongos que sofreram lesão por IR.

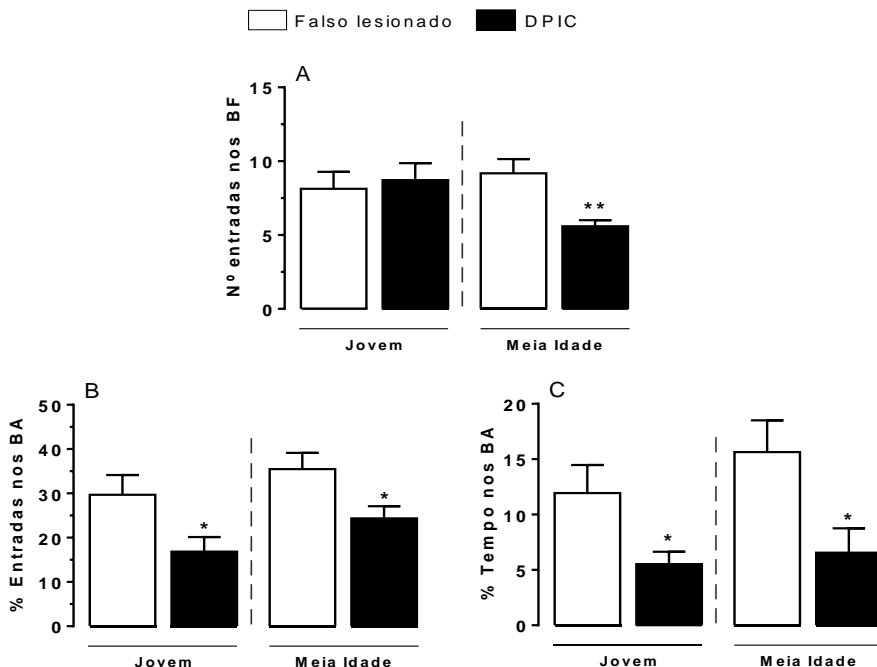


Figura 28. Atividade locomotora e comportamento tipo-ansioso induzido pela IR em camundongos no teste do Labirinto em Cruz Elevado.

O painel A mostra que houve uma diminuição na atividade locomotora dos camundongos de meia idade do grupo DPIC em comparação ao seu respectivo grupo falso lesionado na realização desse teste. Os resultados apresentados no painel B demonstram que houve uma redução na porcentagem de entradas nos BA nos camundongos DPIC adultos jovens e de meia idade em comparação aos seus respectivos grupos falso lesionados. O painel C mostra que ambos animais adultos jovens e velhos do grupo DPIC obtiveram um menor tempo de exploração nos BA em comparação ao seu respectivo grupo falso lesionado (DPIC: dor pós isquemia crônica; BA: Braços Abertos; BF: Braços Fechados). Os dados apresentados representam a média de 7 a 11 animais por grupo e as linhas verticais indicam o EPM. A análise estatística foi realizada por teste *t* de *student* não-pareado entre os grupos avaliados. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, comparados ao respectivo grupo falso lesionado.

5.5 EFEITOS DA IR SOBRE COMPORTAMENTOS RELACIONADOS A DEPRESSÃO

Com a finalidade de observarmos se a IR induziria comportamentos relacionados à depressão, realizamos os testes de suspensão da cauda e o *Splash Test*. Os dados apresentados na figura 29 mostram que os camundongos submetidos a IR (grupo DPIC, tanto adultos jovens quanto de meia idade) apresentaram aumento no tempo do comportamento de imobilidade, quando comparados com os seus respectivos grupos controle no teste de suspensão da cauda. Esse comportamento sugere um estado tipo-depressivo nos camundongos.

Corroborando com o achado anterior, foi realizado o *Splash test*, o qual avalia o comportamento de anedonia nos camundongos. A figura 30 A apresenta a latência para a primeira lambida da pata no *Splash Test*. Conseguimos observar que houve diferença estatística na latência para a primeira lambida da pata nos animais adultos jovens e de meia idade do grupo DPIC, os quais obtiveram uma maior latência para iniciar este comportamento ($p < 0,05$ quando comparados aos seus respectivos grupos falso lesionados). A Figura 30 B, mostra o tempo (s) de *grooming* (autolimpeza) dos camundongos e observa-se que os camundongos DPIC de ambos os grupos (adultos jovens e meia idade) obtiveram um menor tempo do comportamento de autolimpeza nesse teste. Esses dados em conjunto sugerem um comportamento anedônico dos camundongos que sofreram lesão por IR.

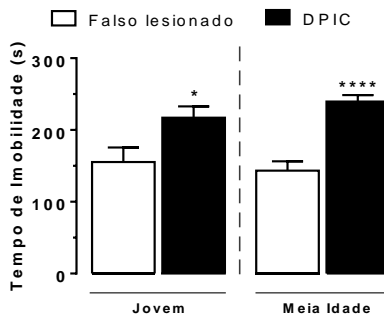


Figura 29. Avaliação do comportamento tipo-depressivo em camundongos utilizando o teste da suspensão da cauda.

O parâmetro avaliado foi o tempo de imobilidade do animal ao teste. Foi observado que os camundongos que sofreram a IR obtiveram um maior período de imobilidade no teste quando comparados aos seus respectivos grupos controle (DPIC: dor pós isquemia crônica). Os dados apresentados representam a média de 7 a 12 animais por grupo e as linhas verticais indicam o EPM. A análise estatística foi realizada por teste *t* de *student* não-pareado entre os grupos avaliados. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ comparados ao respectivo grupo falso lesionado.

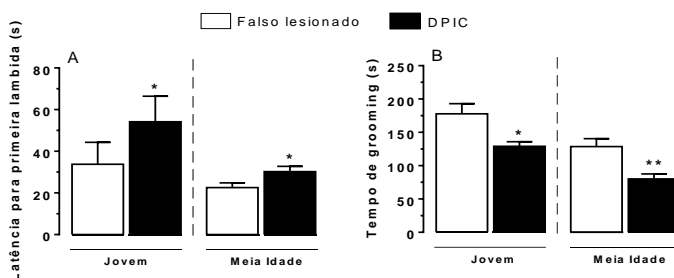


Figura 30. Avaliação de comportamento relacionado a depressão em camundongos utilizando o *Splash Test*.

Os resultados apresentados no painel A demonstram uma maior latência para a primeira lambida da pata nos camundongos submetidos à IR (grupo DPIC) tanto nos camundongos adultos jovens, quanto de meia idade. O painel B demonstra que os camundongos submetidos à IR de ambos os grupos (adultos jovens e meia idade) obtiveram um menor tempo no comportamento de autolimpeza. (DPIC: dor pós isquemia crônica). Os dados apresentados representam a média de 7 a 12 animais por grupo e as linhas verticais indicam o EPM. A análise estatística foi realizada por teste *t* de *student* não-pareado entre os grupos avaliados. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, comparados ao respectivo grupo falso lesionado.

5.6 EFEITOS DA IR SOBRE A MEMÓRIA ESPACIAL

Após a avaliação da atividade locomotora e dos comportamentos relacionados à ansiedade, foi realizada a avaliação da memória espacial dos camundongos através do teste do Y-maze.

A figura 31 mostra os resultados obtidos no teste do Y-maze. O painel A mostra o número de entradas (alternâncias) feito pelos camundongos nos braços do aparato. Observamos neste painel que não houve diferenças estatísticas entre os camundongos adultos jovens, porém o grupo submetido a IR (grupo DPIC) dos camundongos de meia idade obteve um menor número de entradas no aparato, o que denota uma menor atividade locomotora neste teste. Os próximos painéis da figura 31 serão avaliados da seguinte forma: Cada barra no gráfico representa um braço do aparato. Como o camundongo é um roedor essencialmente exploratório, o teste se baseou na preferência inata desse animal por explorar áreas que não foram previamente exploradas, ou seja, áreas que o animal não lembra/conhece. Assim, a estatística foi realizada comparando a porcentagem de entradas e tempo de permanência do camundongo contra um valor hipotético de 33,33% de chances que os camundongos tinham de entrar ou permanecer em cada braço. Sendo assim, o painel B demonstra a porcentagem de entradas em cada braço do aparato durante a realização do teste. Conseguimos observar neste painel que os animais adultos jovens do grupo falso lesionado conseguiram lembrar que não haviam explorado previamente o braço “novo” ao obterem uma maior porcentagem de entradas nesse braço ($p < 0,05$, contra um valor hipotético de 33,33% de chances de entrar em outros braços); resultado que não foi reproduzido nos animais adultos jovens que sofreram lesão por IR. No painel C observamos a porcentagem de tempo que os camundongos adultos jovens permaneceram explorando cada braço do aparato durante o período do teste. É possível observar que os camundongos do grupo falso lesionado lembraram que nunca haviam estado no braço “novo” e, por conseguinte, permaneceram um maior período de tempo neste braço ($p < 0,054$, contra um valor hipotético de 33,33% de chances de permanecer naquele braço); resultado que, mais uma vez, não foi observado no grupo dos animais adultos jovens DPIC.

No painel D observamos a porcentagem de entradas nos braços do aparato feitas pelos camundongos de meia idade. Nesse painel podemos observar que, assim como nos animais adultos jovens, os camundongos de meia idade do grupo falso lesionado lembraram que nunca estiveram no braço “novo” e, assim, obtiveram uma maior

porcentagem de entradas nesse braço ($p < 0,05$ contra um valor hipotético de 33,33%); resultado que não foi reproduzido nos camundongos que sofreram lesão por IR. O painel E, nos mostra a porcentagem de tempo que os camundongos de meia idade permaneceram em cada braço do aparato. Conseguimos observar que os animais de meia idade do grupo falso lesionado lembraram que nunca haviam permanecido no braço “novo” e, assim, permaneceram uma maior porcentagem de tempo nesse braço ($p < 0,05$ contra um valor hipotético de 33,33%). Interessantemente, os camundongos de meia idade do grupo DPIC não só reduziram a porcentagem de exploração ao braço “novo”, como também obtiveram uma diferença estatística contra o seu respectivo grupo falso lesionado ($p < 0,05$ em comparação ao respectivo grupo falso lesionado), sugerindo um déficit de memória espacial nesse teste.

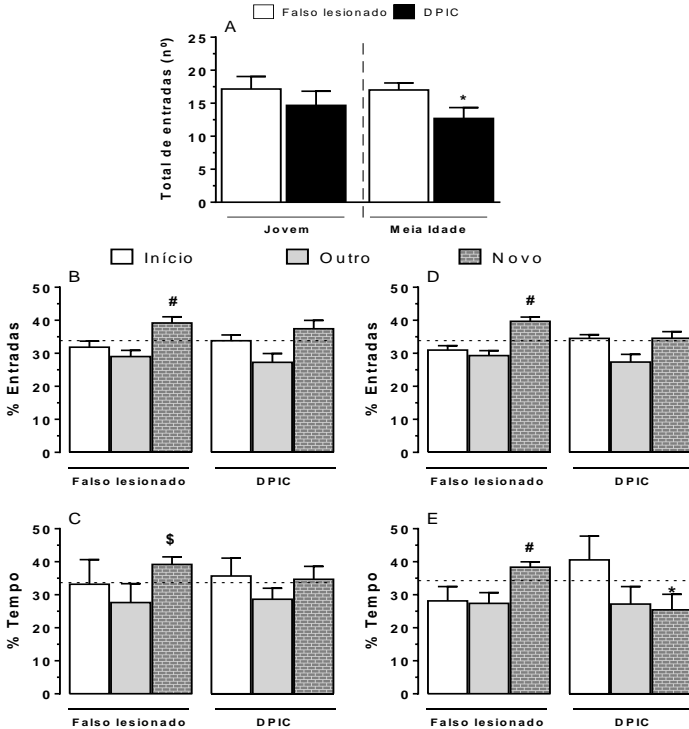


Figura 31. Avaliação da memória espacial em camundongos utilizando a tarefa do Y-maze modificado.

Os parâmetros analisados foram: (A) mostra o número total de entradas (alternâncias) nos braços do aparato; (B) mostra a (%) de entradas no braço Início, Outro e Novo pelos camundongos adultos jovens; (C) mostra a (%) tempo nos braços Início, Outro e Novo pelos camundongos adultos jovens; (D) mostra a (%) de entradas no braço Início, Outro e Novo pelos camundongos de meia idade; (E) mostra a (%) de tempo nos braços Início, Outro e Novo pelos camundongos de meia idade (DPIC: dor pós isquemia crônica). Os dados apresentados representam a média de 7 a 12 animais por grupo e as linhas verticais indicam o EPM. A análise estatística do painel A foi realizada por teste *t* de *student* não-pareado entre os grupos avaliados. Para os painéis B, C, D e E a estatística foi realizada com teste *t* de *Student* contra um valor hipotético de 33,33% de chance dos camundongos entrarem (% entradas) ou permanecerem (% de tempo) nos braços do aparato. * $p < 0,05$, comparados ao respectivo grupo falso lesionado; # $p < 0,05$, contra valor hipotético de 33,33% de entradas ou tempo usando test-*t*; \$ $p < 0,054$, contra valor hipotético de 33,33%).

5.7 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA “EX VIVO”

A fim de verificar se a lesão periférica causada pela IR da pata alterou as concentrações de citocina pró-inflamatória (TNF- α) e neurotrofina (BDNF) no hipocampo e medula dos camundongos, essas estruturas foram coletadas para análise no décimo sétimo dia após a IR.

5.7.1 EFEITO DA IR SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE TNF- α NO HIPOCAMPO E MEDULA DOS CAMUNDONGOS

Neste trabalho, optamos por, na hora da coleta do hipocampo, separar os hemisférios esquerdo e direito a fim de avaliar se a possível alteração nas concentrações de citocinas e neurotrofina seria “hemisfério dependente”. A figura 32 destaca que a indução da IR no tornozelo direito dos camundongos foi capaz de promover significativo aumento nas concentrações de TNF- α no hipocampo esquerdo de ambos animais adultos jovens e meia idade do grupo DPIC, quando comparados aos seus respectivos grupos falso lesionados (Figura 32 A, $p < 0,05$). Interessantemente este aumento não foi evidenciado no hemisfério ipsilateral à lesão (hemisfério direito) nos grupos avaliados (Figura 32 B).

A figura 33 demonstra que houve um aumento na concentração de TNF α na medula espinal dos camundongos de meia idade do grupo que sofreu a lesão por IR ($p < 0,01$); porém nos animais adultos jovens foi observado um aumento não significativo dessa citocina em relação ao grupo falso lesionado.

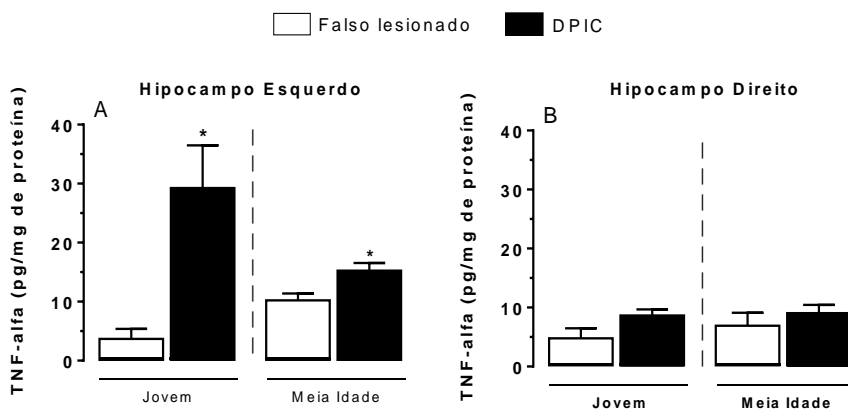


Figura 32. Concentrações de TNF- α no hipocampo de camundongos que passaram ou não pelo protocolo de indução da SDCR-I através da IR da pata.

Dezessete dias após a IR, o hipocampo foi coletado, separado em hemisférios Esquerdo e Direito, e posteriormente analisado. Observamos que houve um aumento nas concentrações de TNF- α no hipocampo esquerdo do grupo DPIC nos animais adultos jovens e meia idade em comparação aos seus respectivos controles. Não é observada diferença estatística nas concentrações de TNF- α no hipocampo direito (DPIC: dor pós isquemia crônica). Os dados apresentados representam a média de 4 a 6 animais por grupo e as linhas verticais indicam o EPM. A análise estatística foi realizada por teste t de *student* não pareado entre os grupos avaliados. * $p < 0,05$, comparado ao respectivo grupo falso lesionado.

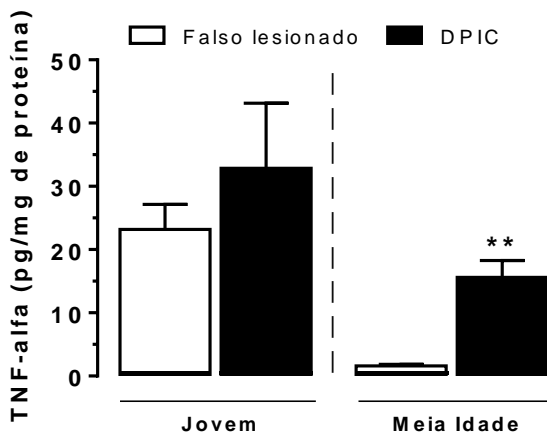


Figura 33. Concentrações de TNF- α na medula de camundongos que passaram ou não pelo protocolo de indução da SDCR-I através da IR da pata.

Dezessete dias após a IR, a medula foi coletada e posteriormente analisada. Observamos que houve um aumento nas concentrações de TNF- α na medula do grupo DPIC nos animais de meia idade em comparação ao seu respectivo controle. Não é observada diferença estatística nas concentrações de TNF- α na medula dos camundongos adultos jovens (DPIC: dor pós isquemia crônica). Os dados apresentados representam a média de 4 a 7 animais por grupo e as linhas verticais indicam o EPM. A análise estatística foi realizada por teste t de *student* não pareado entre os grupos avaliados. * $p < 0,05$, comparado ao respectivo grupo falso lesionado.

5.7.2 EFEITO DA IR NAS CONCENTRAÇÕES DE BDNF NO HIPOCAMPO E MEDULA ESPINAL DOS CAMUNDONGOS

Foi observado uma significativa redução nas concentrações de BDNF no hipocampo esquerdo dos camundongos adultos jovens do grupo DPIC (Figura 34 A, $p < 0,05$), porém essa redução não foi significativa nos animais DPIC do grupo meia idade.

Interessantemente, no hemisfério ipsilateral à lesão, ou seja, no direito ocorreu aumento das concentrações de BDNF nos camundongos adultos jovens do grupo DPIC (Figura 34 B), não se alterando as concentrações dessa neurotrofina nos animais meia idade.

A figura 35 demonstra que houve um aumento na concentração de BDNF na medula espinal dos animais adultos jovens e meia idade que sofreram lesão por IR quando comparados aos seus grupos falso lesionados.

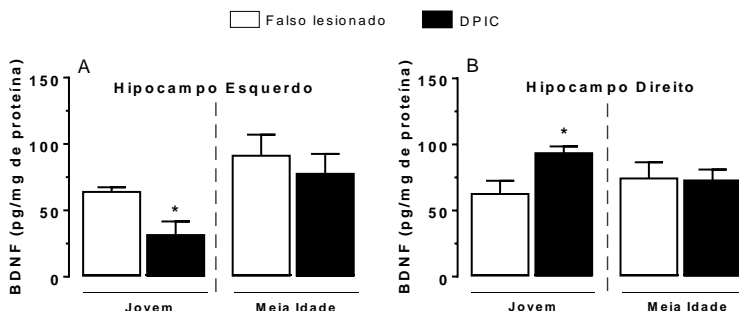


Figura 34. Concentrações de BDNF no hipocampo de camundongos que passaram ou não pelo protocolo de indução da SDCR-I através da IR da pata.

Dezessete dias após a IR, o hipocampo foi coletado, separado em hemisférios Esquerdo e Direito, e posteriormente analisado. Observamos que houve uma diminuição nas concentrações de BDNF no hipocampo esquerdo do grupo DPIC nos animais adultos jovens em comparação ao grupo falso lesionado. É evidenciado também um aumento nas concentrações de BDNF no grupo DPIC dos animais adultos jovens. Não há diferenças estatísticas nas concentrações de BDNF nos animais de meia idade (DPIC: dor pós isquemia crônica; IR: isquemia e reperfusão). Os dados apresentados representam a média de 7 a 11 animais por grupo e as linhas verticais indicam o EPM. A análise estatística foi realizada por

teste *t* de *student* não-pareado entre os grupos avaliados. $*p < 0,05$, comparado ao respectivo grupo falso lesionado.

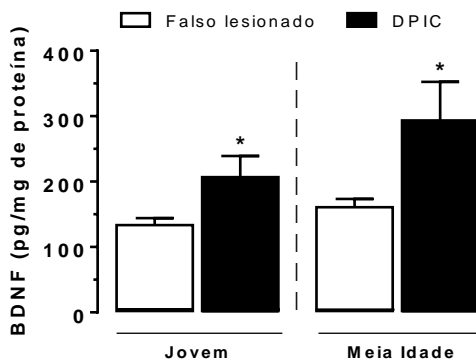


Figura 35. Concentrações de BDNF na medula espinal de camundongos que passaram ou não pelo protocolo de indução da SDCR-I através da IR da pata.

Dezessete dias após a IR, a medula foi coletada para análise. Observou-se que houve um aumento nas concentrações de BDNF na medula dos camundongos adultos jovens quanto de meia idade do grupo DPIC em comparação aos seus respectivos grupos falso lesionados (DPIC: dor pós isquemia crônica). Os dados apresentados representam a média de 5 a 9 animais por grupo e as linhas verticais indicam o EPM. A análise estatística foi realizada por teste *t* de *student* não pareado entre os grupos avaliados. $*p < 0,05$, comparado ao respectivo grupo falso lesionado.

6 DISCUSSÃO

A Síndrome da Dor Complexa Regional tipo I (SDCR-I), é uma disfunção cientificamente intrigante que geralmente se desenvolve após um trauma periférico em um membro (Azqueta-Galvado *et al.*, 2016) causando uma ampla variedade de sinais e sintomas sensoriais, vasomotores, sudomotores e motores/tróficos (Harden *et al.*, 2013). Seu prognóstico é incerto com frequente cronificação das disfunções e dificuldade no tratamento, tornando-se assim, um grande problema clínico.

Embora o diagnóstico clínico da síndrome já esteja bem documentado, e as formas de tratamento tenham melhorado na última década, há uma ampla gama de mecanismos fisiopatológicos que iniciam e perpetuam a síndrome, os quais ainda são foco de pesquisas em andamento (Pleger *et al.*, 2014). Assim, quanto melhor elucidados forem estes mecanismos, melhor será a compreensão da fisiopatologia em si, facilitando futuras intervenções terapêuticas. Nesse sentido, já se sabe que estes mecanismos envolvem isquemia, inflamação (Liman *et al.*, 2015), sensibilização periférica e central (Lenz *et al.*, 2013), fatores genéticos (Bruehl, 2010), autoimunidade (Kohr *et al.*, 2009; Dubuis *et al.*, 2014), distúrbios do sistema nervoso simpático (Borchers & Gershwin, 2014), reorganização cortical mal adaptativa no córtex somatossensorial (Swart *et al.*, 2009), disfunção dos córtices pré-frontal, motor (Pleger *et al.*, 2014), parietal (Cohen *et al.*, 2013), bem como aumento do pléxo coróide (Zhou *et al.*, 2015) e recentemente também tenha sido evidenciado disfunções nos núcleos da base (Azqueta-Galvado *et al.*, 2016).

Desse modo, pode se observar que vários são os esforços e pesquisas que visam compreender como as disfunções periféricas afetam a anatomia e funções corticais superiores na SDCR-I. Nesse sentido, este estudo procurou compreender quais as alterações cognitivo-emocionais seriam geradas em um modelo animal de IR – o qual mimetiza os sinais característicos da SDCR-I -, bem como buscou observar a participação da citocina TNF- α e da neurotrofina BDNF na manutenção dessas disfunções em camundongos.

Coderre e colaboradores (2004) desenvolveram um modelo animal em ratos com sinais comparáveis aos descritos em humanos com SDCR-I (Groeneweg *et al.*, 2009) o que foi um grande marco no estudo dos mecanismos fisiopatológicos da síndrome. Concomitantemente, outros grupos de pesquisa caminhavam ao encontro de tentar desenvolver novos modelos para estudo da síndrome a exemplo do grupo do Coderre.

Guo e colaboradores (2004) encontraram resultados interessantes ao desenvolverem um modelo após fratura do osso tibial de ratos, porém, apesar de ainda ser usado, o prolongado período de imobilização tornou-se um problema para transpor o modelo para a clínica, uma vez que na maior parte dos pacientes com SDCR-I, a imobilização agrava os sintomas.

Alguns anos depois, Ludwig e colaboradores (2007) elaboraram outro modelo animal no qual realizavam uma ligadura da artéria femoral em ratos durante 3 horas, com posterior liberação e reperusão da mesma. Entretanto, as respostas sensoriais nesse modelo não foram muito bem evidenciadas após a IR da artéria femoral. A principal diferença entre o modelo animal do grupo do Coderre e o modelo do grupo do Ludwig é que a ligadura da artéria femoral reduz o fluxo sanguíneo para a pata a quase zero, mas as veias são poupadas, o que não ocorre no torniquete da pata (Bratti, 2011). Isto faz com que o modelo do Coderre e colaboradores (2004) se torne mais semelhante ao que ocorre na clínica, uma vez que a SDCR-I ocorre geralmente após um trauma em que ambos vasos sanguíneos (veias e artérias) são atingidos da mesma forma.

Tendo em mente o supracitado, utilizamos o modelo animal criado por Coderre e colaboradores (2004), o qual foi posteriormente adaptado para camundongos (Millecamps *et al.*, 2010), com algumas modificações, a citar: optamos por utilizar a linhagem C57BL/6, pois segundo dados do nosso laboratório, esta linhagem se mostra eficiente em testes de memória (assunto que tange este trabalho); optamos também por alterar o número de anéis elásticos (de 1 para 5 anéis) na realização do torniquete, pois devido ao fato de os animais C57BL/6 serem menores em comparação aos camundongos Swiss, seus membros inferiores eram menos espessos. Assim, ao realizarmos testes pilotos, houve a necessidade de uma maior compressão para gerar a lesão por IR semelhante a encontrada em animais Swiss. Dessa forma, primeiramente foram realizados testes para padronização do número de borrachas que seriam necessárias para reproduzir os sinais e sintomas clássicos presentes na síndrome, tendo a IR por 5 anéis os melhores resultados.

Embora a maioria dos estudos pré-clínicos com a SDCR-I sejam feitos em roedores machos, Tajerian e colaboradores (2015a) buscaram avaliar as diferenças em parâmetros cognitivo-comportamentais e bioquímicos entre camundongos machos e fêmeas em um modelo de SDCR-I por fratura e imobilização da tíbia. Nesse estudo, os autores evidenciaram que camundongos fêmeas exibiam maior alodínia mecânica, disfunção motora e déficits de memória aversiva em comparação com os camundongos machos. Todavia, não houve

diferenças entre os sexos nas medidas de edema e temperatura em qualquer momento da avaliação (Tajerian *et al.*, 2015a). Na avaliação bioquímica, o respectivo estudo mostrou diferenças nas concentrações do receptor de glutamato NR2b na medula espinal dos dois grupos, sugerindo diferenças entre os sexos nos mecanismos de sensibilização central, os quais poderiam explicar as diferenças na duração e gravidade dos sintomas da SDCR-I entre os sexos (Tajerian *et al.*, 2015a).

De Mos e colaboradores (2007) citam que não existe uma faixa etária específica com que o indivíduo venha a desenvolver a SDCR-I. Neste sentido, ao pensarmos em uma maneira de obtermos dados que pudessem abranger uma maior população e que houvesse uma maior transposição dos resultados, decidimos realizar o protocolo experimental da IR em camundongos adultos jovens (6 meses de vida) e meia idade (12 meses de vida).

Dessa forma, os achados mais relevantes do presente trabalho foram que: 1) o modelo adaptado de IR que utilizamos conseguiu reproduzir os sinais e sintomas clássicos da SDCR-I (alodínia mecânica, hipersensibilidade térmica ao frio, edema e aumento da temperatura da pata); 2) observamos que houve um prejuízo cognitivo-emocional nos camundongos submetidos à lesão por IR gerando respostas comportamentais deficitárias em testes de memória espacial, bem como gerando comportamentos relacionados à ansiedade e depressão; 3) houve um aumento das concentrações de TNF- α no hipocampo e medula espinal dos animais após a lesão por IR quando comparados aos animais falso lesionados; 4) houve alterações nas concentrações da neurotrofina BDNF no hipocampo (redução no hipocampo esquerdo e aumento no hipocampo direito dos camundongos adultos jovens) e medula (aumento da concentração de BDNF) de ambos animais adultos jovens e meia idade dezessete dias após a lesão por IR quando também comparados aos animais falso lesionados; 5) as alterações das concentrações de citocina e neurotrofina hipocampal foram hemisfério-dependentes.

No primeiro momento, o presente estudo procurou investigar se o aparecimento dos sinais e sintomas clássicos da SDCR-I seguia uma resposta dependente do tempo no modelo animal de IR. De fato, conseguimos observar que os camundongos que passaram pelo procedimento de IR da pata desenvolveram alodínia mecânica e hiperalgesia térmica ao frio (5°C), dados que são corroborados por achados descritos na literatura (Bratti, 2011), e que confirmam que a sensibilização central e periférica que está presente na clínica, também é observada no modelo de SDCR-I.

A lesão tecidual oriunda por um estímulo lesivo de origem física, química ou mecânica gera a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios e a ativação de células do sistema imune que, em conjunto, podem iniciar e manter um quadro de sensibilização dolorosa central e periférico (Carvalho & Lemônica, 1998) que é observado neste trabalho.

Esses achados de hipersensibilidade térmica e alodínia mecânica vão ao encontro da nossa análise bioquímica realizada na medula espinal dos camundongos submetidos à IR, na qual evidenciou-se um aumento das concentrações de citocina TNF- α e da neurotrofina BDNF, conhecidos moduladores da dor. Sabe-se que o TNF- α é uma citocina pró-inflamatória liberada rapidamente no processo inflamatório e que tem a capacidade de iniciar a cascata de ativação de outras citocinas e de fatores tróficos (McDermott, 2001). Ela pode ser liberada por diversas células, inclusive células de Schwann, e exercer seus efeitos através da interação com seu receptor de TNF tipo I (TNRF1), que tem sua expressão aumentada após uma lesão (Schafers *et al.*, 2003). Após agir em seu receptor específico, o TNF- α ativa fatores transcricionais como a p38 MAPK e o NF- κ B, que induzem a fosforilação e a transcrição de genes codificados de citocinas pró-inflamatórias e consequentemente desencadeiam uma cascata inflamatória (Wei *et al.*, 2007). Ainda, é possível constatar que o TNF- α , a exemplo da IL-1 β , IL6 e IL8, participa da indução de hiperalgesia térmica e alodínia mecânica quando administrada por via intraperitoneal (Watkins *et al.*, 1994), subcutânea (Junger & Sorkin, 2000), endoneural (Wagner & Meyers, 1996) ou perineural (Sorkin *et al.*, 1997) em roedores.

Esses dados são importantes, uma vez que pacientes com SDCR-I têm aumento sistêmico de liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e IL-6, além de decréscimo nas concentrações de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10 (Júnior *et al.*, 2016).

De forma semelhante aos nossos achados com a citocina TNF- α , também conseguimos observar um aumento nas concentrações da neurotrofina BDNF na medula dos camundongos submetidos à IR. Esse dado corrobora os achados comportamentais de alodínia mecânica e hipersensibilidade térmica, pois, atualmente, o BDNF é considerado uma neurotrofina pró-nociceptiva desde a demonstração que ela é capaz de promover a ativação da microglia e de neurônios na medula espinal, amplificando a transmissão nociceptiva (Júnior *et al.*, 2016). Meller e colaboradores (1994) demonstraram que as células da glia possuem os mesmos sistemas de receptores e de transdutores de sinal que os neurônios, de forma que existe interação dinâmica entre essas células na amplificação da resposta neuronal à agressão periférica ou central. Assim,

a liberação de BDNF pelas células microgliais ativadas, causa a desinibição dos neurônios nociceptivos de segunda ordem presentes na lâmina I de Rexed da substância cinzenta da medula espinal (Júnior *et al.*, 2016). A modificação induzida pela liberação do BDNF altera a função dos neurônios locais, antes predominantemente inibitória (ou gabaérgica), e, um terço dos neurônios passa a ter ação excitatória (Coull *et al.*, 2005). Estas ações do BDNF nos neurônios excitatórios e inibitórios contribuem para um aumento global da excitabilidade no corno dorsal e, consequentemente, para a perpetuação da transmissão nociceptiva (Wang *et al.*, 2014). Todavia, indo de encontro com nossos achados, Tajerian e colaboradores (2015b) não evidenciaram diferenças nas concentrações de BDNF na medula espinal de camundongos expostos ao modelo de DPIC por fratura da tíbia, fato que possivelmente seja devido à sua avaliação que ocorreu 10 semanas depois da lesão, ou mesmo devido ao tipo de lesão.

Um achado interessante mostrado aqui é a diferença na cronologia da resolução do edema da pata, da hipersensibilidade térmica ao frio, bem como na alteração da temperatura da pata nos animais adultos jovens e meia idade. Observamos que o edema da pata dos animais adultos jovens é identificado já no 3º dia após a IR, com resolução efetiva do quadro no 14º dia. Esse quadro de resolução não é observado nos animais de meia idade, os quais apresentam diferenças no diâmetro da pata no 3º dia após IR, e permanecem com essa diferença entre o diâmetro da pata no 14º dia de avaliação. Observamos também que houve uma resolução do quadro de hipersensibilidade térmica ao frio nos animais DPIC adultos jovens no 10º dia de avaliação, que não ocorreu nos animais de meia idade. Ainda, observamos que houve diferença significativa na temperatura da pata apenas nos animais meia idade (entre o 3º e o 7º dia de avaliação), mas não nos animais adultos jovens. Estes achados permitem sugerir que: 1) o processo inflamatório causado pela IR parece ser dependente da idade, uma vez que nos camundongos de meia idade a resposta edematogênica, de hipersensibilidade térmica ao frio e de hipertermia se mantiveram intensas; 2) os animais adultos jovens podem ter mecanismos compensatórios que os fazem ter uma maior resiliência física ao dano produzido pela IR.

Ademais, sabe-se que quando o fluxo sanguíneo para um determinado tecido é reduzido, a distribuição de oxigênio e de nutrientes também é reduzida, quadro que ocorre durante a IR. Assim, o fluxo sanguíneo se torna muito baixo para manter o metabolismo normal dos tecidos, fazendo com que as bombas iônicas da membrana celular tenham sua atividade comprometida (Guyton & Hall, 2006). Quando isso ocorre,

os íons sódio (Na^+), que normalmente migram para o interior da célula, não conseguem mais ser bombeados para o meio extracelular, de modo que o seu excesso no meio intracelular provoca hipertonicidade da célula, causando edema intracelular (Guyton & Hall, 2006). Ainda, de forma a intensificar o quadro de edema inicial, após o reestabelecimento da perfusão sanguínea, há um aumento da permeabilidade da membrana celular decorrente do processo inflamatório instaurado, permitindo que mais íons Na^+ e outros íons se difundam para o interior da célula, aumentando a hipertonicidade e agravando o edema intracelular (Guyton & Hall, 2006). Assim, a perpetuação de agentes inflamatórios aumenta a demanda metabólica local, o que resulta em aumento do fluxo sanguíneo e da temperatura. Entretanto, a resolução desse quadro é mais rápida e mais eficiente em animais adultos jovens do que em animais com mais idade, de modo que, em animais adultos jovens, a vascularização se ajustará até compensar as necessidades de fluxo sanguíneo do tecido, enquanto, em animais mais velhos, a vascularização frequentemente demora um maior tempo para se reestabelecer (Guyton & Hall, 2006). De forma similar, em humanos também são encontradas mudanças heterogêneas nas respostas vasculares no membro afetado pela SDCR-I (Groeneweg *et al.*, 2009). Bratti (2011) sugere que o aumento da temperatura no membro afetado ocorra devido a uma inibição central dos neurônios vasoconstritores simpáticos. Todavia, utilizar um maior tempo de análise pode melhorar nossa compreensão dessas diferenças e confirmar nossa hipótese.

Um outro achado interessante do presente estudo, foi de que os animais submetidos à IR da pata, apresentaram respostas comportamentais relacionadas à ansiedade e depressão quando comparados aos seus respectivos grupos controle. Já é sabido que a dor pode provocar alterações psicológicas nas pessoas e, de acordo com uma grande parcela dos estudos na área, as características psicológicas dos pacientes com SDCR-I não diferem daqueles de pacientes com outras condições de dor crônica (Beerthuis *et al.*, 2009). Ainda, já foi observado que vários sintomas psicológicos como ansiedade e depressão são comuns em pacientes com SDCR-I (Lohnberg & Altmaier 2013; Rommel, *et al.*, 2001). Não apenas na clínica, como também em estudos pré-clínicos, já foram evidenciados comportamentos tipo-ansiosos (Chen *et al.*, 2013) e déficits de memória de trabalho (Ren *et al.*, 2011) em modelos de dor em roedores.

Esses achados são clinicamente relevantes, pois, segundo Gierthmühlen e colaboradores (2014), fatores psicológicos e comportamentais podem contribuir para a fisiopatologia do SDCR-I.

Embora não tenhamos avaliado, um possível mecanismo pelo qual os fatores psicológicos podem influenciar a SDCR-I, se dá pela liberação sistêmica de catecolaminas devido ao estresse crônico como resultado da ansiedade e depressão, o que pode resultar em aumento da percepção da dor e exacerbação de sinais vasomotores através da regulação dos receptores adrenérgicos (Bruehl & Carlson, 1992). De fato, já foi observado que pacientes com SDCR-I têm um aumento sistêmico na densidade de receptores adrenérgicos (Herlyn *et al.*, 2010).

Nesse sentido, Lee e colaboradores (2002) em um estudo prospectivo, randomizado, simples-cego mostrou que, em associação ao tratamento fisioterapêutico, o tratamento cognitivo-comportamental melhorou os aspectos psicológicos ao mesmo passo que resultou em uma melhora duradoura da dor e na função motora dos pacientes, corroborando a idéia de que as comorbidades psicológicas podem intensificar os sinais e sintomas da SDCR-I. De forma semelhante, esses comportamentos psicológicos observados na clínica podem ser observados em modelos animais (Tajerian *et al.*, 2014).

Adicionalmente, no presente estudo também observamos que os camundongos submetidos à IR da pata desenvolveram comportamentos relacionados à depressão nos testes de Suspensão da Cauda e no *Splash Test*. Nós sugerimos que esses comportamentos são devidos à dor e ao aumento das concentrações de TNF- α hipocampais nos camundongos DPIC.

De fato, é observado que dor e depressão são correlacionadas na clínica (Maletic & Raison, 2009). Uma possível ligação entre esses dois sintomas é o hipocampo, uma região comum às vias neurológicas e aos neurotransmissores que regulam tanto a dor como a depressão (Fasick *et al.*, 2015). Fasick e colaboradores (2015) citam que o hipocampo pode ser alterado por inflamações periféricas. Todavia, o mecanismo de ação das citocinas sistêmicas no encéfalo é motivo de várias especulações (Kraychete *et al.*, 2006), visto que essas substâncias não atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) (Banks & Kastin, 1987). Assim, as citocinas pró-inflamatórias poderiam penetrar no encéfalo por via dos órgãos circunventriculares (áreas onde os capilares são fenestrados), por um processo de transporte ativo através de carreador, ou induzir a geração de outros neuromediadores através da ligação ao endotélio vascular (Watkins *et al.*, 1995). Dragunow (2013) sugere ainda que células meníngeas e células do plexo coroide podem promover um *link* entre a inflamação periférica e a inflamação do SNC.

Interessantemente, observou-se que ocorreu um aumento nas concentrações da citocina pró-inflamatória TNF- α no hipocampo

esquerdo, mas não no direito, dos camundongos submetidos à IR da pata. Sabemos que essa citocina é produzida por vários tipos de células, incluindo células neuronais e gliais no SNC (Tchelingierian *et al.*, 1993), e que há níveis basais de TNF- α no hipocampo. Todavia, o aumento da concentração do TNF- α está associado com o desenvolvimento de depressão (Fasick *et al.*, 2015). Em experimentos pré-clínicos, foi observado que os animais apresentaram comportamento tipo-depressivo após microinfusão intracerebroventricular (i.c.v.) de TNF- α adjacente ao hipocampo (Reynolds *et al.*, 2004). Ainda, além dos vários efeitos nocivos das citocinas nos neurônios, a depressão medeia a ativação de macrófagos cerebrais residentes, incluindo a microglia, que contribuem para a ruptura imunológica existente liberando mais citocinas e agravando o quadro inflamatório central (Frank *et al.*, 2007).

Ainda, já foi postulado que concentrações basais (fisiológicas) de TNF- α estimulam a produção de BDNF, enquanto o aumento da concentração de TNF- α inibem a produção de BDNF (Duric & McCarson, 2005; Schulte-Herbruggen *et al.*, 2005). Esse fato, junto com dados na literatura os quais citam que a depressão está associada com a diminuição na concentração de BDNF hipocampal em análise *post-mortem* de encéfalos de humanos com depressão (Karege *et al.*, 2005), corroboram o nosso achado de diminuição da concentração do BDNF no hipocampo dos camundongos DPIC.

Sabe-se que as funções desempenhadas pelo BDNF são vastas e incluem a regulação e aumento da plasticidade sináptica, sobrevivência e crescimento celular, entre outras. Curiosamente, houve diminuição dessa neurotrofina apenas no hipocampo esquerdo dos camundongos DPIC adultos jovens, com um aumento da mesma no hipocampo direito. Nossa interpretação acerca desse resultado é de que mecanismos compensatórios podem ter desempenhado papel na elevação do BDNF no hipocampo direito a fim de regular a homeostasia dessa estrutura.

Outro resultado interessante no presente estudo foi que os animais submetidos à IR apresentaram déficits de memória espacial de curta duração no teste do Y-maze modificado. No teste do Y-maze modificado, observou-se que os camundongos submetidos à IR da pata, não conseguiram formar memória espacial de curta duração e, após a reexposição (90 minutos depois), não obtiveram diferença estatística entre a porcentagem de entradas e porcentagem de tempo explorando o braço “novo”, assim como observado nos animais do grupo falso lesionado de mesma idade. Fato parecido com o que ocorreu nos animais DPIC de meia idade, os quais também não foi observado diferenças estatísticas na porcentagem de entradas no braço novo, porém,

diferentemente dos animais adultos jovens, eles passaram um tempo significativamente menor explorando o braço “novo”, dado que sugere que esses animais não recordavam que não haviam explorado aquele braço previamente.

É importante salientar que o teste do Y-maze modificado avalia o desempenho da memória espacial de curta duração (Castro *et al.*, 2013; Soares *et al.*, 2013). De fato, os animais precisavam fazer associações entre as pistas espaciais ambientais para formar um mapa cognitivo que os ajudasse a encontrar a localização do braço previamente inexplorado (Dellu *et al.*, 1997). Vale ressaltar que o teste do Y-maze modificado não é aversivo, uma vez que não requer a privação de alimentos (em oposição, por exemplo, ao labirinto radial) ou choque elétrico das patas (em oposição, por exemplo, à tarefa de esquivas inibitória), o que poderia modificar o estado emocional e motivacional dos animais (Bekker *et al.*, 2006), confundindo assim com os parâmetros de memória espacial analisados (Soares *et al.*, 2013).

Nossas interpretações acerca desses resultados de memória espacial vão ao encontro do que a literatura traz sobre a repercussão negativa que a inflamação periférica e central possui sobre a função cognitiva de aquisição, consolidação e evocação de memórias.

Em humanos, inflamações sistêmicas são associadas com déficits em uma variedade de tarefas cognitivas e de memória (Hudetz *et al.*, 2009; Shapira-Lichter *et al.*, 2008). De fato, pacientes com SDCR-I apresentam comprometimentos cognitivos (McCracken & Iverson, 2001) e déficits de memória (Schnurr & Macdonald, 1995).

A sinalização inflamatória é considerada como um contribuinte crítico para a modulação de curto e longo prazo na memória (Donzis & Tronson, 2014). No entanto, o papel preciso e os mecanismos pelos quais as citocinas modulam as memórias ainda são um assunto a ser estudado (Donzis & Tronson, 2014). Ademais, a nossa hipótese é que a citocina TNF- α , a qual encontrou-se elevada no hipocampo, pode estar associada ao déficit cognitivo observado nos animais que sofreram a lesão por IR no teste do Y-maze. Embora saibamos que eventos inflamatórios não são específicos do aumento de uma única citocina ao longo do tempo, mas sim pela regulação dinâmica de um conjunto destas (Conti *et al.*, 2008), bem como que o processamento mnemônico não está isolado em uma única estrutura encefálica, mas sim em uma ampla gama delas. Broadbent e colaboradores (2004) citam que disfunções hipocâmpais acabam por resultar em déficits de memória espacial. Assim, sugerimos que a citocina TNF- α , a qual encontrou-se elevada no hipocampo, pode estar envolvida

ao déficit cognitivo observado no teste do Y-maze nos animais que sofreram a lesão por IR.

De fato, o TNF- α tem sido consistentemente implicado em déficits de memória e plasticidade sináptica (Donzis & Tronson, 2014). Uma explicação plausível para esse resultado de déficit cognitivo se da através da via de sinalização intracelular mediadas por Janus Quinase/Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição (JAK/STAT), ativadas quando o TNF- α se liga ao seu receptor na membrana. Várias citocinas convergem nos mesmos caminhos de transdução de sinal (Donzis & Tronson, 2014). Em particular, muitos exercem a sua ação através da cascata de sinalização iniciada por JAK/STAT (Heim, 1999; Murray, 2007) e as vias de proteína quinase ativada por mitogénio (MAPK) (Kaminska, 2005). O segundo mensageiro e as vias de transcrição são também amplamente conservadas através dos sistemas e as mesmas cascatas de sinalização são necessárias tanto para as funções imunitárias como cognitivas, desempenhando papel na sinalização inflamatória e na formação da memória (Donzis & Tronson, 2014). Assim, esses pontos de convergência entre a transdução de sinal dependente de citocinas e os da memória podem ser uma maneira pela qual estes sistemas interagem. Em consonância com o supracitado, p38 MAPK e JNK são ativadas e desempenham papéis causais na inibição da LTP pelo TNF- α (Butler *et al.*, 2004).

Ainda, fatores psicológicos como depressão e ansiedade podem resultar em aumento da dor ao longo do tempo (Campbell *et al.*, 2003). Isso foi evidenciado neste estudo, uma vez que os animais de meia idade apresentaram um maior comportamento anedônico e tipo-depressivo, o que podemos correlacionar com os maiores níveis de dor, prolongamento do edema e aumento da temperatura da pata.

Coletivamente, esses dados fornecem evidências de alterações bioquímicas no encéfalo e medula de camundongos que acompanham comportamentos relacionados a ansiedade (alterações no número e tempo de permanência nos BA no teste do LCE), bem como comportamentos relacionados a depressão (aumento do tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda e comportamento de anedonia no *Splash Test*) e déficit de memória espacial de curta duração (Y-maze) em um modelo de SDCR-I em camundongos. Ainda, evidenciamos que alterações nas concentrações de TNF- α e BDNF são diferentes nos dois hemisférios hipocampusais.

No entanto, apesar dos resultados positivos encontrados no presente trabalho, julga-se necessário a continuação e ampliação desses estudos, aumentando o tempo de avaliação a fim de verificar, por

exemplo, até quando as disfunções cognitivo-emocionais seriam evidenciadas.

Em síntese, os nossos dados claramente mostram que o modelo animal de SDCR-I possui relevância e pode ser translacional para a clínica; uma vez que, os camundongos com DPIC apresentam dor persistente e comorbinadas como déficit na memória, ansiedade e depressão semelhante ao que ocorre em humanos com SDCR-I.

7 CONCLUSÃO

Atualmente, várias são as pesquisas que visam compreender como disfunções periféricas afetam funções corticais superiores na SDCR-I. Outrossim, a SDCR-I caracteriza-se como uma disfunção cientificamente intrigante com um grande leque de processos biológicos ocorrendo simultaneamente. Neste trabalho, evidenciamos as repercussões comportamentais e bioquímicas de um modelo experimental de SDCR-I, chamado de Dor Pós-Isquemia Crônica (DPIC), em camundongos, as quais foram:

- O modelo de DPIC provocou alodínia mecânica, hipersensibilidade térmica ao frio que pôde ser evidenciada ao longo dos dias de avaliação nos camundongos adultos jovens e de meia idade;
- O edema da pata mostrou ser mais duradouro nos camundongos de meia idade do que nos animais adultos jovens, porém este não prejudicou a locomoção dos animais;
- Os camundongos DPIC adultos jovens e de meia idade apresentaram comportamentos relacionados à ansiedade (evidenciado no LCE) e depressão (evidenciado no teste de suspensão da cauda e no *Splash test*);
- Os camundongos DPIC adultos jovens e de meia idade apresentaram déficit na memória espacial de curta duração no teste do Y-maze;
- Ocorreram diferenças nas concentrações de citocina (TNF- α) e neurotrofina (BDNF) nos hemisférios direito e esquerdo do hipocampo, bem como na medula espinal dos camundongos DPIC.

Assim, acreditamos que esse conjunto de dados se faz relevante, uma vez que corrobora e amplia os achados da literatura acerca das disfunções e repercussão comportamental e bioquímica de um modelo experimental de SDCR-I em camundongos.

REFERÊNCIAS

AAN, H.R.M.; MATHEW, S.J.; CHARNEY, D.S. Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. **Can Med Assoc Jour.** v.180: p.305-13. 2009.

APKARIAN, A. V.; BUSHNELL, M. C.; TREEDE, R. D. & ZUBIETA, J. K. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. **Eur. J. Pain.** v.9, p.463–484. 2005.

APKARIAN, A.V.; HASHMI, J.A.; BALIKI, M.N. Pain and the brain: specificity and plasticity of the brain in clinical chronic pain. **Pain.** v.152:S49–64. 2011.

ASMUNDSON, G.J. & KATZ J. Understanding the co-occurrence of anxiety disorders and chronic pain: state-of-the-art. **Depress Anxiety.** v.26: 888–901. 2009.

AZQUETA-GAVALDON, M.; *et al.* Basal ganglia dysfunction in complex regional pain syndrome – A valid hypothesis? **Eur J Pain.** v.21(3):415-424. 2016.

BANKS, W.A. & KASTIN, A.J. Saturable transport of peptides across the blood-brain barrier. **Life Science.** v.41: 1319-38. 1987.

BARON R. & WASNER, G. Complex regional pain syndromes. **Curr Pain Headache Rep.** v.5(2):114–23. 2011.

BASBAUM, A. I. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell.** v. 139, n. 2, p. 267-284. 2009.

BASBAUM, A.I. e JESSELL, T. The Perception of Pain. In: Kandel, E.R.; Schwartz, J.; Jessell, T., editors. **Princip of Neurosc.** New York: Appleton and Lange; p. 472-491. 2000.

BAUER, C. S. *et al.* The increased trafficking of the calcium channel subunit $\alpha 2\delta$ -1 to presynaptic terminals in neuropathic pain is inhibited by the $\alpha 2\delta$ ligand pregabalin. **J. Neurosci.** v.29, 4076–4088. 2009.

BEERTHUIZEN, A. *et al.* Is there an association between psychological factors and the Complex Regional Pain Syndrome type 1 (CRPS1) in adults? A systematic review. **Pain**. v.145. 52–59. 2009.

BEKKER, A.; SHAH, R.; QUARTERMAIN, D.; LI, Y.S.; BLANCK, T. Isoflurane preserves spatial working memory in adult mice after moderate hypoxia. **Anesth Analg**. v.102:1134–1138. 2006.

BERROCOSO, E.; IKEDA, K.; SORA, I.; UHL, G.R.; *et al.* Active behaviours produced by antidepressants and opioids in the mouse tail suspension test. **Intern Jour of Neuropsychopharmac**. 16. 151–162. 2013.

BIANCHI C *et al*: Long-term functional outcome measures in corticosteroid-treated complex regional pain syndrome. **Eur Medicophys** v.42(2):103-111. 2006.

BIRKLEIN, F. & MAIHÖFNER, C. Use your imagination: training the brain and not the body to improve chronic pain and restore function. **Neurology**. v.67:2115–6. 2006.

BIRKLEIN, F. & SCHLERETH, T. Complex regional pain syndrome-significant progress in understanding. **Pain**. v.156 (1): S94-103. 2015.

BIRKLEIN, F. *et al.* Neurological findings in complex regional pain syndromes – analysis of 145 cases. **Acta Neurol Scand**. v.101:262–9. 2000.

BONICA, J.J. The Management of Pain. **Philadelphia**: Lea & Febiger, 1953.

BORCHERS, A. T. & GERSHWIN, M. E. Complex regional pain syndrome: a comprehensive and critical review. **Autoimmun. Rev**. v.13, 242–265. 2014.

BOURIN, M. *et al.* N., & HASCOET, M. Animal models of anxiety in mice. **Fund Clin Pharmac**. v.21, 567–574. 2007.

BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytic Biochem.** v.72, p.248-254. 1976.

BRATTI, T. Caracterização comportamental, bioquímica e farmacológica e efeito da natação sobre o modelo experimental da síndrome da dor complexa regional tipo I em camundongos. 22 fevereiro de 2011. 105p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 22 fev, 2011.

BROADBENT, N.J. *et al.* Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.101 (40). p.14515–14520. 2004.

BROMLEY, M.M.; BÖRSBO, B.; ROVNER, G. *et al.* Is pain intensity really that important to assess in chronic pain patients? A study based on the Swedish Quality Registry for Pain Rehabilitation (SQRP). **PLoS One.** V.8:e65483. 2013.

BRUEHL, S. & CARLSON, C. R. Predisposing psychological factors in the development of reflex sympathetic dystrophy. A review of the empirical evidence. **Clin. J. Pain.** v.8, 287–299. 1992.

BRUEHL, S. An update on the pathophysiology of complex regional pain syndrome. **Anesthesiology.** v.113: 713–725. 2010.

BRUEHL, S.; HARDEN, R.N.; GALER, B.S. *et al.* Complex regional pain syndrome: Are there distinct subtypes and sequential stages of the syndrome? **Pain.** v.95:119–124. 2002.

BUHLE, J. & WAGER, T.D. Performance-dependent inhibition of pain by an executive working memory task. **Pain.** v.149:19–26 2010.

BUSSA, M. *et al.* Complex regional pain syndrome type I: a comprehensive review. **Acta Anaesthesiol Scand.** v.59: 685–697. 2015.

BUTLER, M., CONNOR, J.J.; MOYNAGH, P. Dissection of TNF- α inhibition of LTP reveals a p38 MAPK-dependent mechanism which maps to early but not late-phase LTP. **Neuroscience.** v.124: 319–326. 2004.

CALABRESE, F.; MOLTENI, R.; RACAGNI, G.; RIVA, M.A. Neuronal plasticity: A link between stress and mood disorders. **Psychoneuroendocrinology**. v.34: S208-16. 2009.

CAMPBELL, L.C.; CLAUW, D.J.; KEEFE, F.J. Persistent pain and depression: a biopsychosocial perspective. **Biol Psychiatry**. v.54:399–409. 2003.

CAPELA, C. *et al.* Associação da qualidade de vida com dor, ansiedade e depressão. **Fisioter Pesqui**. v.16, n.3, p.263-8. 2009.

CARDOSO-CRUZ H. *et al.* Instability of spatial encoding by CA1 hippocampal place cells after peripheral nerve injury. **Eur J Neurosci**. v.33: 2255–64. 2011.

CARDOSO-CRUZ, H. *et al.* Prefrontal Cortex and Mediodorsal thalamus reduced connectivity is associated with spatial working memory impairment in rats with inflammatory pain. **Pain**. v.154. 2397–2406. 2013.

CARVALHO, W.A. LEMÔNICA, L. Mecanismos Celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos. **Rev Bras Anesthesiol**. v. 48: n.2: 137 – 158. 1998.

CASTRO, A. A. Estratégias De Neuroproteção Em Modelos Animais Da Doença De Parkinson: Avaliação Bioquímica E Comportamental. 21 de fevereiro de 2013. 160 páginas. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina. 2013.

CEPEDA, M.S.; LAU, J.; CARR, D.B. Defining the therapeutic role of local anesthetic sympathetic blockade in complex regional pain syndrome: a narrative and systematic review. **Clin J Pain**. 18 (4), 216–233. 2002.

CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; CHUNG, J. M.; YAKSH, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neur Methods**, v. 53, p. 55-63. 1994.

CHAPMAN, C.R. Psychological aspects of pain. in PAPPAGALO, M. The neurological basis of pain. **Mc Garw-Hills Companies Inc.** 157-167. 2005.

CHEN, J. *et al.* The contribution of TNF- in the amygdala to anxiety in mice with persistent inflammatory pain. **Neurosc Lett.** v.541. 275–280. 2013.

CODERRE, T. J. *et al.* Chronic post-ischemia pain (CPIP): A novel animal model of complex regional pain syndrome-Type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. **Pain**, v. 112, n. 1–2, p. 94–105, 2004.

COGNATO, G.P.; AGOSTINHO, P.M.; HOCKEMEYER, J. *et al.* Caffeine and adenosine A2A receptor antagonists prevent memory impairment and synaptotoxicity in adult rats triggered by a convulsive episode in early life. **J Neurochem.** v.112(2). p.453–462. 2010.

COHEN, H. *et al.* Clinical evidence of parietal cortex dysfunction and correlation with extent of allodynia in CRPS type 1. **Eur J Pain.** v.17.527–538. 2013.

CONTI, B.; TABAREAN, I.; SANCHEZ-ALAVEZ, M.; DAVIS, C.; BROWNELL, S.; BEHRENS, M.; BARTFAI, T. Cytokines and the Brain. **Elsevier.** v.6. p. 19-38. 2008.

CORDON, F.C.O. & LEMONICA, L. Síndrome Dolorosa Complexa Regional: Epidemiologia, Fisiopatologia, Manifestações Clínicas, Testes Diagnósticos e Propostas Terapêuticas. **Rev Bras Anesthesiol.** v.52: n.5: p.618 – 627. 2002.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annu Rev Neurosci.** v.32: 1–32. 2009.

COULL, J.A.M. *et al.* BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. **Nature.** v.438. 1017-1021. 2005.

DAVIS, K.D.; KISS, Z.H.; TASKER, R.R.; DOSTROVSKY JO. Thalamic stimulation-evoked sensations in chronic pain patients and in nonpain (movement disorder) patients. **J Neurophysiol.** v.75: 1026–37. 1996.

DE MOS, M. *et al.* Role of NF-kappaB in an animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I). **J Pain.** v.10: 1161–69. 2009.

DE MOS, M. *et al.* The incidence of complex regional pain syndrome: a population-based study. **Pain.** v.129:12–20. 2007.

DEL VALLE, L. *et al.* Spinal cord histopathological alterations in a patient with longstanding complex regional pain syndrome. **Brain, Behav Immun.** v.23. 85–91. 2009.

DELLU, F.; FAUCHEY, V.; LEMOAL, M.; SIMON, H. Extension of a new two-trial memory task in the rat: influence of environmental context on recognition processes. **Neurobiol Learn Mem.** v.67:112–120. 1997.

DERSH, J.; POLATIN, P.B.; GATCHEL, R.J. Chronic pain and psychopathology: Research findings and theoretical considerations. **Psychosom Med.** v.64:773–86. 2002.

DOMMERHOLT J. Complex regional pain syndrome-1: History, diagnostic criteria and etiology. **J Bodywork Ther.** v.8: p.167–177. 2004.

DONZIS, E.J. & TRONSON, N. C. Modulation of learning and memory by cytokines: signaling mechanisms and long term consequences. **Neurobiol Learn Mem.** v.115: p.68-77. 2014.

DRAGUNOW, M. Meningeal and choroid plexus cells—Novel drug targets for CNS disorders. **Brain Research.** v.1501. p.32 – 55. 2013.

DRUMMOND, P.D. Sensory disturbances in complex regional pain syndrome: clinical observations, autonomic interactions, and possible mechanisms. **Pain Med.** v.11: 1257–66. 2010.

DRZYZGA, L.R.; MARCINOWSKA, A.; OBUCHOWICZ, E. Antiapoptotic and neurotrophic effects of antidepressants: a review of clinical and experimental studies. **Brain Res Bull.** v.79:248-57. 2009.

DUBUIS, E.; THOMPSON, V.; LEITE, M.I.; BLAES, F.; MAIHOFNER, C. *et al.* Longstanding complex regional pain syndrome is associated with activating autoantibodies against alpha-1a adrenoceptors. **Pain**. v.155(11): p.2408–2417. 2014.

DUMAN, R.S. Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. **Neuromol. Med.** v.5.11–25. 2004.

DURIC, V. & MCCARSON, K.E. Hippocampal neurokinin-1 receptor and brain derived neurotrophic factor gene expression is decreased in rat models of pain and stress. **Neuroscience**. v.133. 999–1006. 2005.

EBERLE, T. *et al.* Warm and cold complex regional pain syndromes: Differences beyond skin temperature? **Neurology**. v.72;505-512. 2009.

ELTZSCHIG, H.K. & ECKLE, T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation **Natur Med.** v.17 (n.11): 1391-1401. 2011.

EVANS, J. Reflex sympathetic dystrophy. **Surg Gynecol Obstet**. v.82: 36–43. 1946.

FAGUNDES, D.J. & TAHA, M.O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrg Bras** - Vol 19 (1): 59-65. 2004.

FASICK, V. *et al.* The hippocampus and TNF: Common links between chronic pain and depression. **Neurosc Biobehav Rev**. v.53. 139–159. 2015.

FELIU, M.H.; EDWARDS, C.L. Psychologic factors in the development of complex regional pain syndrome: History, myth, and evidence. **Clin J Pain**. v.26: 258–63. 2010.

FERREIRA, L.M. & FERREIRA, L.R.K. Experimental model: historic and conceptual revision. **Acta Cir Bras**. v.18:1-3. 2003.

FERREIRA, L.M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M.V.J. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cir Bras**. Vol 20 (Supl. 2). 2005.

FIELD, J. Complex Regional Pain Syndrome: a review. **J Hand Surg.** v.38:(6). p.616–626. 2013.

FISHBAIN, D.A. *et al.* Chronic pain-associated depression: Antecedent or consequence of chronic pain? A review. **Clin J Pain.** v.13: p.116–37. 1997.

FORTUNATO, J.J.; *et al.* Acute harmine administration induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the rat hippocampus. **Prog Neuropsychopharm Biol Psychiatry.** v.33(8): p. 1425-30. 2009.

FRANK, M.G., BARATTA, M.V., SPRUNGER, D.B., WATKINS, L.R., MAIER, S.F.. Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS proinflammatory cytokine responses. **Brain Behav. Immun.** v.21. p. 47–59. 2007.

FREEDMAN, M.; GREIS, A.C.; MARINO, L.; SINHA, A.N.; HENSTENBURG, J. Complex Regional Pain Syndrome: Diagnosis and Treatment. **Phys Med Rehabil Clin.** v.25. p.291–303. 2014.

FU, Y.; HAN, J.; ISHOLA, T.; *et al.* PKA and ERK, but not PKC, in the amygdala contribute to pain-related synaptic plasticity and behavior. **Mol Pain.** v4: 26. 2008.

GADOTTI, V.M.; BONFIELD, S.P. E ZAMPONI, G.W. Depressive-like behaviour of mice lacking cellular prion protein. **Behav Brain Res.** v. 227: 319–323. 2012.

GALLACE, A.; TORTA. D. M.; MOSELEY, G. L. & IANNETTI, G. D. The analgesic effect of crossing the arms. **Pain** v.152, 1418–1423. 2011.

GASPAR, A.T. & ANTUNES, F. Síndrome doloroso regional complexo tipo I. **Acta Med Port.** V.24: 1031-1040. 2011.

GERRITS, M.M. *et al.* Longitudinal association between pain, and depression and anxiety over four years. **J Psychosom Research** v.78. 64–70. 2015.

GERRITS, M.M. *et al.* Pain and the onset of depressive and anxiety disorders. **Pain**. v.155:53–9. 2014.

GIERTHMÜHLEN, J.; BINDER, A.; BARON, R. Mechanism-based treatment in complex regional pain syndromes. **Nat Rev Neurol**. v.10(9):518-28. 2014.

GOH, E.L. *et al.* Complex regional pain syndrome: a recent update. **Burns Trauma**. 5:2. 2017.

GORSUCH, W.B. *et al.* The Complement System in Ischemia-Reperfusion Injuries. **Immunobiology**. v.217(11): 1026–1033. 2012.

GRIEPP M. A follow-up study of 14 young adults with complex regional pain syndrome type I. **J. Neurol Assoc**. 2000.

GROENEWEG, G.; HUYGEN, F. J. P. M.; CODERRE, T. J.; ZIJLSTRA, F. J. Regulation of peripheral blood flow in Complex Regional Pain Syndrome: clinical implication for symptomatic relief and pain management. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 10. p. 116. 2009.

GUO, T. Z.; *et al.* Substance P signaling contributes to the vascular and nociceptive abnormalities observed in a tibial fracture rat model of complex regional pain syndrome type I. **Pain**. v. 108. p. 95–107. 2004.

GUYTON, A. C. & HALL, J. E. **Textbook of medical physiology**, 11th. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006.

HAGGARD, P., IANNETTI, G. D. & LONGO, M. R. Spatial sensory organization and body representation in pain perception. **Curr. Biol**. 23, R164–R176. 2013.

HALLADIN, N.L. *et al.* Lower limb ischemia and reperfusion injury in healthy volunteers measured by oxidative and inflammatory biomarkers. **Perfusion**. v.30(1):64-70. 2015.

HARDEN R. A clinical approach to complex regional pain syndrome. **Clin J Pain**. v.16: p.26–32. 2000.

HARDEN, R.N. *et al.* Proposed new diagnostic criteria for complex regional pain syndrome. **Pain Med.** v.8: p326–331. 2007.

HARDEN, R.N.; *et al.* Complex Regional Pain Syndrome: Practical Diagnostic and Treatment Guidelines, 4th Edition. **Pain Med.** v.14: p.180–229. 2013.

HEBERT, A. E. & DASH, P. K. Nonredundant roles for hippocampal and entorhinal cortical plasticity in spatial memory storage. **Pharmac, Biochem Behav.** v.79: 143–153. 2004.

HEIM, M.H. The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus. **J Recep Sig Transd.** v.19(1–4):75–120. 1999.

HERLYN, P. *et al.* Frequencies of polymorphisms in cytokines, neurotransmitters and adrenergic receptors in patients with complex regional pain syndrome type I after distal radial fracture. **Clin J Pain.** v.26:175–81. 2010.

HERVERA , A. *et al.* The Role of Nitric Oxide in the Local Antiallodynic and Antihyperalgesic Effects and Expression of μ -Opioid and Cannabinoid-2 Receptors during Neuropathic Pain in Mice. **J Pharm Exp Ther.** v.334, No. 3. 887-896. 2010.

HILDERINK, P.H. *et al.* The temporal relation between pain and depression: results from the longitudinal aging study amsterdam. **Psychosom Med.** v.74:945–51. 2012.

HOTCHKISS, R.S. *et al.* Cell death. **N. Engl. J. Med.** v.361, 1570–1583. 2009.

HUDETZ, J.A.*et al.* Ketamine attenuates post-operative cognitive dysfunction after cardiac surgery. **Acta Anaesthesiol Scand.** v.53(7):864–872. 2009.

IOLASCON, G.; SIRE, A.; MORETTI, A.; GIMIGLIANO, F. Complex regional pain syndrome (CRPS) type I: historical perspective and critical issues. In: Brandi, L.M. **Clinic Cases Miner Bone Metab.** 12(Suppl. 1): 4-10. 2015.

ISINGRINI, E.; CAMUS, V.; GUIQUET, A.M.; *ET AL.* Association between Repeated Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) Procedures with a High Fat Diet: A Model of Fluoxetine Resistance in Mice. **PLoS ONE**, 5(4): 1-8. 2010.

IZQUIERDO, I. A arte de esquecer – cérebro, memória e esquecimento. Rio de Janeiro: **Vieira Lent**. 2004.

JANIG, W.; STANTON-HICKS, M.; Reflex Sympathetic. Dystrophy: A Reappraisal. Progress in Pain Research and Management. **IASP Press**, Seattle. 1996.

JONG, J. R., VLAEYEN, J. W., DE GELDER, J. M., & PATIJN, J. Pain-related fear, perceived harmfulness of activities, and functional limitations in complex regional pain syndrome type I. **J Pain**, 12(12), 1209–1218. 2011.

JONG, J.R.; VLAEYEN, J.W.; ONGHENA, P, *et al.* Reduction of pain-related fear in complex regional pain syndrome type I: the application of graded exposure in vivo. **Pain**. v.116(3):264–75. 2005.

JULIUS, D. e BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, n.6852, p.203-10. 2001.

JUNGER, H. & SORKIN, L.S. Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNF. **Pain**. 85: 145-51. 2000.

JÚNIOR, J.O.O. *et al.* Inflammatory mediators of neuropathic pain. **Rev Dor. São Paulo**. v.17(Suppl 1):S35-42. 2016.

JUSZCZAK, G.R.; SLIWA, A.T.; WOLAK, P. *Et al.* The usage of video analysis system for detection of immobility in the tail suspension test in mice. **Pharmacol, Biochem Behav**. 85: 332–338. 2006.

KANG, H.J. *et al.*, Longitudinal associations between BDNF promoter methylation and late-life depression. **Neurobiol Aging**. v.36(4). 2015.

KAMINSKA, B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits. **Biochim Bioph Acta**. v.1754(1–2): 253–262. 2005.

KAREGE, F.; VAUDAN, G.; SCHWALD, M.; PERROUD, N.; LA HARPE, R. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. **Mol. Brain Res.** v.136, 29–37. 2005.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. (Pathophysiology of pain). **Arch of Vet Sci.** v. 13, 1, p. 1-12, 2008.

KOHR, D.; TSCHERNATSCH, M.; SCHMITZ, K.; SINGH, P.; KAPS, M.; SCHAFER, K.H. *et al.* Autoantibodies in complex regional pain syndrome bind to a differentiation-dependent neuronal surface autoantigen. **Pain.** v.143(3): p. 246–251. 2009.

KRAYCHETE, D.C. *et al.* Citocinas Pró-inflamatórias e Dor. **Rev Bras Reumatol.** v. 46. n.3. p. 199-206. 2006.

KUMAR, V.; BHAT, Z.A.; KUMAR, D. Animal models of anxiety: A comprehensive review. **J Pharmac Tox Met.** v.68. 175–183. 2013.

KUNER R. Central mechanisms of pathological pain. **Nat Med.** v.16: 1258–66. 2010.

LAU, F.H. & CHUNG, K.C. Silas Weir Mitchell, MD: The physician who discovered causalgia. **J Hand Surg.** v.29: p.181–187. 2004.

LEE, B. H. *et al.* Physical therapy and cognitive– behavioral treatment for complex regional pain syndromes. **J. Pediatr.** v.141, 135–140. 2002.

LEßMANN, V. & BRIGADSKI, T. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: An update. **Neurosci Res.** v.65:11-22. 2009.

LENZ, M. *et al.* Local cytokine changes in complex regional pain syndrome type I (CRPS I) resolve after 6 months. **Pain.** v.154(10): p.2142–9. 2013.

LEWIS, J.S.; KERSTEN, P.; MCCABE, C.S.; MCPHERSON, K.M.; BLAKE, D.R. Body perception disturbance: a contribution to pain in complex regional pain syndrome (CRPS). **Pain.** 133: 111–19. 2007.

LIBON, D. J. *et al.* Neuropsychological deficits associated with complex regional pain syndrome. **J Intern Neuropsych Soc.** v.16(3), 566–573. 2010.

LIMAN, S. *et al.* Preventive Treatment with Ketamine Attenuates the Ischaemia-Reperfusion Response in a Chronic Postischaemia Pain Model. **Oxid Med Cell Longev.** p.1-9. 2015.

LOHNBERG, J.A. & ALTMAIER, E.M. A review of psychosocial factors in complex regional pain syndrome. **J Clin Psychol Med Settings.** v.20: 247–54. 2013.

LUDWIG, J. *et al.* Behavioral and sensory changes after direct ischemia-reperfusion injury in rats. **Eur J Pain,** v.11. p. 677-684. 2007.

MAIHOFNER, C. *et al.* Complex regional pain syndromes: new pathophysiological concepts and therapies. **Eur J Neurol.** v.17(n.5): 649–660. 2010.

MAIHOFNER, C. *et al.* Cortical reorganization during recovery from complex regional pain syndrome. **Neurology.** v.63: 693–701. 2004.

MALATYNSKA, E.; STEINBUSCH, H.W.M.; REDKOZUBOVA, O. *et al.* Anhedonic-like traits and lack of affective deficits in 18-month-old C57BL/6 mice: Implications for modeling elderly depression. **Exp Geront.** v.47(8): 552–564. 2012.

MALETIC, V. & RAISON, C.L. Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain. **Front Biosc.** v.14: 5291-5338. 2009.

MANJI, H.K. *et al.* Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult to treat depression. **Biol Psychiatry.** v.53:707-42. 2003.

MANJI, H.K.; DREVETS, W.P.; CHARMEY, D.S. The cellular neurobiology of depression. **Nature Med.** v.7: 541-7. 2001.

MARINUS, J. *et al.* Clinical features and pathophysiology of complex regional pain syndrome. **Lancet Neurol.** 10, 637–648. 2011.

MCCRACKEN, L.M. & IVERSON, G.L. Predicting complaints of impaired cognitive functioning in patients with chronic pain. **J Pain Symptom Manage.** v.21:392–6. 2001.

MCDERMOTT, M.F. TNF and TNFr biology in health and disease. **Cell Mol Biol.** v.47: 619-35, 2001.

MCGAUGH, J.L. Memory — a Century of Consolidation. **Science.** v.287. 248. 2000.

MCMAHON, S.B.; BENNETT, D.L.H.; BEVAN, S. Inflammatory mediators and modulators of pain. In: McMahon, SB.; Koltzenburg, M., editors. Wall and Melzack's textbook of Pain. **Elsevier**; p.49-72. 2008.

MCWILLIAMS, L.A.; COX, B.J.; ENNS, M.W. Mood and anxiety disorders associated with chronic pain: An examination in a nationally representative sample. **Pain.** v.106: 127–33. 2003.

MECHAN, A. O. *et al.* A comparison between Dark Agouti and Sprague–Dawley rats in their behavior on the elevated plus-maze, open-field apparatus and activity meters and their response to diazepam. **Psychopharmac.** v.159. p.188–195. 2002.

MELLER, S.T. *et al.* The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. **Neuropharmac.** v.33. 1471–1478. 1994.

MESSLINGER, K. What is a nociceptor? **Anaesthesist**, v.46, n. 2, p. 142-53. 1997.

MIKA, J.; JURGA, A.M.; STARNOWSKA, J.; WASYLEWSKI, M. *ET AL.* Effects Of Chronic Doxepin And Amitriptyline Administration In Naive Mice And In Neuropathic Pain Mice Model. **Neuroscience**, 294: 38–50. 2015.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol.** v. 57, n. 1, p. 1-164. 1999.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.** v. 66, p. 355-474. 2002.

MILLECAMPS, M.; ETIENNE, M.; JOURDAN, D.; ESCHALIER, A.; ARDID, D. Decrease in non-selective, non-sustained attention induced by a chronic visceral inflammatory state as a new pain evaluation in rats. **Pain**. v.109. 214–224. 2004.

MILLECAMPS, M.; LAFERRIÈRE, A.; RAGAVENDRAN, J. V.; STONE, L. S.; CODERRE, T. J. Role of peripheral endothelin receptors in an animal model of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS-I). **Pain**. v. 151, p. 174-183. 2010.

MITCHELL, S.W. *et al.* Gunshot wounds and other injuries of nerves. **Philadelphia, J.B. Lippincott**. 173p. 1864.

MITCHELL, S.W. Injuries of nerves and their consequences. **JB Lippincott, Philidelphia**. 1872.

MORETTI, M.; COLLA, A.; BALEN, G.O. *et al.* Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **J of Psychiatric Research**. v.46: 331-340. 2012.

MORIARTY, O. *et al.* The effect of pain on cognitive function: a review of clinical and preclinical research. **Prog. Neurobiol**. v.93, 385–404. 2011.

MOSELEY, G.L. Distorted body image in complex regional pain syndrome. **Neurology**. v.65(5): 773. 2005.

MOSELEY, G.L. Graded motor imagery for pathologic pain: a randomized controlled trial. **Neurology**. v.67(12): 2129–2134. 2006.

MURAKAMI, H. *et al.* Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly, **Neurosci. Res**. v.53: 129–139. 2005.

MURRAY, P.J. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. **J Immun**. v.178(5):2623–2629. 2007.

OGAWA, S. *et al.* Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium. Increased monolayer

permeability and induction of procoagulant properties. **J. Clin. Invest.** v.85, 1090–1098. 1990.

OGAWA, S. *et al.* Hypoxia-induced increased permeability of endothelial monolayers occurs through lowering of cellular cAMP levels. **Am. J. Physiol.** v.262, C546–C554. 1992.

O'KEEFE, J.; DOSTROVSKY, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. **Brain Research.** v.34 (1): 171–175. 1971.

OKUDAN, B. & CELİK, C. Determination of inflammation of reflex sympathetic dystrophy at early stages with Tc-99 m HIG scintigraphy: preliminary results. **Rheumatol Inter.** v. 26: 404–408. 2006.

PALMER, G. Complex regional pain syndrom. **Aust Prescr.** v.38(3): 82–86. 2015.

PEDERSEN, L.H.; SCHEEL-KRUGER, J.; BLACKBURN-MUNRO, G. Amygdala GABA-A receptor involvement in mediating sensory-discriminative and affective-motivational pain responses in a rat model of peripheral nerve injury. **Pain.** v.127: 17–26. 2007.

PEREZ, R.S. *et al.* CRPS I task force. Evidence based guidelines for complex regional pain syndrome type I. **BMC Neurology.** 10: 20. 2010.

PERITO, M.E.S. & FORTUNATO, J.J. Marcadores Biológicos da Depressão: Uma Revisão Sobre a Expressão de Fatores Neurotróficos. **Rev Neurocienc.** v.20(4):597-603. 2012.

PISERA, D. Fisiologia da dor. In: Dor Avaliação e Tratamento em Pequenos Animais. OTERO, P. E. **São Paulo:Interbook.** p. 30-74. 2005.

PLEGER, B. *et al.* Complex Regional Pain Syndrome Type I Affects Brain Structure in Prefrontal and Motor Cortex. **PLoS One.** v.9;9(1). 2014.

PREDIGER, R.D.S. *et al.* The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Experiment Neurol.** v.202. 391–403. 2006.

PURVES, Dale *et al.* Neurociências. 4. ed. Porto Alegre: **Artmed**. 2010.

QUINTÃO, N.L. *et al.* Long-lasting neuropathic pain induced by brachial plexus injury in mice: Role triggered by the pro-inflammatory cytokine, tumour necrosis factor alpha. **Neuropharmacol.** v.50, n. 5, p. 614- 20. 2006.

QUISEL A, GILL JM, WITHERELL P: Complex regional pain syndrome which treatments show promise? **J Fam Pract.** v.54(7):599-603. 2005.

REYNOLDS, J.L.; IGNATOWSKI, T.A.; SUD, R.; SPENGLER, R.N. Brain-derived tumor necrosis factor-alpha and its involvement in noradrenergic neuron functioning involved in the mechanism of action of an antidepressant. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v.310. p.1216–1225. 2004.

REN, W. *et al.* Peripheral Nerve Injury Leads to Working Memory Deficits and Dysfunction of the Hippocampus by Upregulation of TNF- α in Rodents. **Neuropsychopharmac.**v.36, 979–992. 2011.

REXED, B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. **J. Comp. Neurol.** v.96, 414–495. 1952.

RHO, R.H.; BREWER, R.P.; LAMER, T.J.; WILSON, P.R. Complex regional pain syndrome. **Mayo Clin Proc.** v.77: p.174–180. 2002.

RIJN, M.A. *et al.* Spreading of complex regional pain syndrome: not a random process. **J Neural Transm** v.118: 1301–1309. 2011.

RIJN, M.A.; MARINUS, J.; PUTTER, H.; VAN HILTEN, J.J. Onset and progression of dystonia in complex regional pain syndrome. **Pain.** v.130: 287–93. 2007.

RODGERS, R.J. & JOHNSON, N.J. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine plus-maze test of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v.52 (2). 297–303. 1995.

ROMMEL, O.; MALIN, J.P.; ZENZ, M.; JANIG, W. Quantitative sensory testing, neurophysiological and psychological examination in

patients with complex regional pain syndrome and hemisensory deficits. **Pain**. v.93: 279–93. 2001.

ROWBOTHAM, M.C. Pharmacologic management of complex regional pain syndrome. **Clin J Pain**. v.22(5):425-9. 2006.

RUSSELL B. História do pensamento ocidental. **São Paulo: Ed. Publicações S/A**; 2001.

SALIBI, A.; SEARLE, A.E.; LINDAU, T.R. Complex regional pain syndrome: a systemic review of the literature, the past, present and future management. **J Pain Relief**. v.3: 1–11. 2014.

SALTIK, S. *et al.* Pregabalin Treatment of a Patient With Complex Regional Pain Syndrome. **Pediatric Neurology**. v.54: 88-90. 2016.

SANDRONI, P.; BENRUD-LARSON, L.M.; MCCLELLAND, R.L.; LOW, P.A. Complex regional pain syndrome type I: incidence and prevalence in Olmsted county, a population based study. **Pain**. v.103: p.199–207. 2003.

SCHAFERS, M.; SVENSSON, C.I.; SOMMER, C.; SORKIN, L.S. Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38MAPK in primary sensory neurons. **J Neurosci**. v.23:2517-2521. 2003.

SCHMIDT, H.D.; BANASR, M.; DUMAN, R.S. Future Antidepressant Targets: Neurotrophic Factors and Related Signaling Cascades. **Drug Discov Today Ther Strateg**. v.5:151-6. 2008.

SCHNURR, R.F. & MACDONALD, M.R. Memory complaints in chronic pain. **Clin J Pain** v.11:103–11. 1995.

SCHULTE-HERBRUGGEN, O. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 regulate secretion of brain-derived neurotrophic factor in human monocytes. **J. Neuroimmunol**. v.160. p.204–209. 2005.

SCHWARTZMAN, R.J.; MCLELLAN, T.L. Reflex sympathetic dystrophy: A review. **Arch Neurol**. v.44: 555–561. 1987.

SEBASTIN, S. J. Complex regional pain syndrome. **Ind J of plast surgery**. v. 44, n. 2, p. 298-307. 2011.

SEYBOLD, V.S. The role of peptides in central sensitization. *Handb Exp Pharmacol*. v.451–91. 2009.

SHAH, A. & KIRCHNER, J.S. Complex regional pain syndrome. **Foot Ankle Clin N Am** v.16: 351–366. 2011.

SHAPIRA-LICHTER, I. *et al*. Cytokines and cholinergic signals co-modulate surgical stress-induced changes in mood and memory. **Brain Behav Immunity**. v.22. 388–398. 2008.

SILVEIRA, M. & YOSHIDA, W.B. Isquemia e reperfusão em músculo esquelético: mecanismos de lesão e perspectivas de tratamento. **J Vasc Br**. v.3(4):367-78. 2004.

SOARES, E.; PREDIGER, R.D.; NUNES, S.; CASTRO, A.A. *et al*. Spatial Memory Impairments In A Prediabetic Rat Model. **Neuroscience**. v.250. p.565–577. 2013.

SORKIN, L.S.; XIAO, W.H.; WAGNER, R.; MYERS, R.R. Tumour necrosis factor-alpha induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. **Neuroscience** 81: 255-62. 1997.

SQUIRE, L. R. Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. **Psych Rev**. v.99 (2): 195–231. 1992.

STANTON-HICKS, M. Complex regional pain syndrome (type I, RSD; type II, causalgia): controversies. **Clinic Jour of Pain**. v. 16 (2 Suppl): p.33–40. 2000.

STANTON-HICKS, M.; JANIG, W.; HASSENBUSCH, S.; *ET AL*. Reflex sympathetic dystrophy: Changing concepts and taxonomy. **Pain**. v.63(1), p.127–133. 1995.

STERU, L. *et al*. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacol**. v.85, 367–370. 1985.

SUDECK, P. Über die akute entzündliche Knochenatrophie. **Arch Klin Chir.** v.62: p.147–156. 1900.

SULIMAN, S.; HEMMINGS, S.M.; SEEDAT, S. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) protein levels in anxiety disorders: systematic review and meta-regression analysis. **Front Integr Neurosci.** v.7(5). p.1-11. 2013.

SWART, C.M.A. *et al.* Cortical changes in complex regional pain syndrome (CRPS). **Europ Journ of Pain.** v.13. p.902–907. 2009.

TAJERIAN, M. & CLARK, J.D. New Concepts in Complex Regional Pain Syndrome. **Hand Clin.** v.32: 41–49. 2016.

TAJERIAN, M. *et al.* Sex differences in a Murine Model of Complex Regional Pain Syndrome. **Neurobiol of Learning and Memory.** v.123. 100–109. 2015a.

TAJERIAN, M. *et al.* Differential Efficacy of Ketamine in the Acute *versus* Chronic Stages of Complex Regional Pain Syndrome in Mice **Anesthesiology.** v.123 (6):1435-47. 2015b.

TAJERIAN, M.; LEU, D.; ZOU, Y. *et al.* Brain neuroplastic changes accompany anxiety and memory deficits in a model of complex regional pain syndrome. **Anesthesiol** v.121: 852–865. 2014.

TAKATS, G. Reflex dystrophy of the extremities. **Arch Surg.** v.34: 939–56. 1937.

TAN, E.C. *et al.* Complex regional pain syndrome type I in children. **Acta Paediatr.** v.97:875–879. 2008.

TCHELINGERIAN, J.L. QUINONERO, J.; BOOSS, J.; JACQUE, C. Localization of TNF alpha and IL-1 alpha immunoreactivities in striatal neurons after surgical injury to the hippocampus. **Neuron.** v.10. 213–224. 1993.

TODD, A.J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **Nature Reviews.** v.11. 2010.

TRANQUILLI, W. J. Fisiologia da dor aguda. In: GREENE, S. A. **Segredos em anestesia veterinária e manejo da dor**. Porto Alegre: Artmed, p. 399-402. 2004.

UCEYLER, N.; EBERLE, T.; ROLKE, R.; BIRKLEIN, F.; SOMMER, C. Differential expression patterns of cytokines in complex regional pain syndrome. **Pain**. v.132: p.195–205 2007.

VAN HILTEN J.J. *et al.* Clinical aspects of multifocal or generalized tonic dystonia in reflex sympathetic dystrophy. **Neurology**. v.56: 1762–65. 2001.

VARANDAS P. O modelo da neuroplasticidade na depressão. **Saúde Mental**. v.5:23-8. 2003.

VELDMAN, P.H.; REYNEN, H.M.; ARNTZ, I.E.; GORIS, R.J. Signs and symptoms of reflex sympathetic dystrophy: prospective study of 829 patients. **Lancet**. v.342: 1012–6. 1993.

VERA-PORTOCARRERO, L.P.; ZHANG, E.T.; OSSIPOV, M.H.; *et al.* Descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains nerve injury-induced central sensitization. **Neuroscience**. v.140(4): 1311-1320. 2006.

VERMA, L. & JAIN, N.S. Central histaminergic transmission modulates the ethanol induced anxiolysis in mice. **Behavioural Brain Research**. 313. 38–52. 2016.

VUSSE, A.C. *et al.* Randomised controlled trial of gabapentin in complex regional pain syndrome type I. **BMC Neurol**. 4:13. 2004.

WAGNER, R. & MYERS, R.R. Endoneurial injection of TNF-alpha produces neuropathic pain behaviors. **Neuroreport**. v.7: 2897-901. 1996.

WANG, F. *et al.* Epigenetic modification of DRG neuronal gene expression subsequent to nerve injury: Etiological contribution to complex regional pain syndromes (Part II). **Med Sci Monit**. v.20: 1188–1200. 2014.

WATERHOUSE, E.G.; XU, B. New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. **Mol Cell Neurosci.** v.42:81-9. 2009.

WATKINS, L.R. *et al.* Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. **Brain Res.** 654: 15-26, 1994.

WATKINS, L.R.; MAIER, S.F.; GOEHLER, L.E. Cytokine-to-brain communication: A review & analysis of alternative mechanisms. **Life Sci.** v.57:1011-26. 1995.

WEI, X.H. *et al.* Peri-sciatic administration of recombinant rat TNF-alpha induces mechanical allodynia via upregulation of TNF-alpha in dorsal root ganglia and in spinal dorsal horn: the role of NF-kappa B pathway. **Exp Neurol.** v.205(2):471-84. 2007.

WEINER, D.K.; RUDY, T.E.; MORROW, L.; SLABODA, J.; LIEBER, S. The relationship between pain, neuropsychological performance, and physical function in community-dwelling older adults with chronic low back pain. **Pain Med.** v.7, 60–70. 2006.

WOOLF, C.J. & THOMPSON, S.W. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. **Pain.** v.44: 293–99. 1991.

WOOLF, C.J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain.** v.152: S2–S15. 2011.

YALCIN, I.; BOHREN, Y.; WALTISPERGER, E. *ET AL.* Time-Dependent History of Mood Disorders in a Murine Model of Neuropathic Pain. v.70. p. 946–953. 2011.

YOSHIDA, W.B. Radicais livres na síndrome da isquemia e reperfusão. **Cir Vasc Angiol.** v.12:82-95. 1996.

YOSHIMURA, M. & FURUE, H. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. **J Pharmacolo Scie.** v. 101, p. 107-117. 2006.

ZHOU, G. *et al.* Enlargement of choroid plexus in complex regional pain syndrome. **Scientific Reports**. 5, Article number: 14329. 2015.

ZIMMERMANN, B.J. & GRANGER, D.N. Reperfusion injury. **Surg Clin North Am**. v.72: 65-83. 1992.

ZIMMERMANN, M. Ethical Guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110. 1983.